

Die Expression von Adrenomedullin und Intermedin  
in humanen multipotenten Stromazellen sowie  
humanen Osteosarkomzellen und ihre  
Regulation unter Hypoxie

---

KATHARINA MÜNCH

---



INAUGURALDISSERTATION zur Erlangung des Grades eines **Doktors der Medizin**  
des Fachbereichs Medizin der Justus-Liebig-Universität Gießen



*edition scientifique*  
**VVB LAUFERSWEILER VERLAG**

**Das Werk ist in allen seinen Teilen urheberrechtlich geschützt.**

Jede Verwertung ist ohne schriftliche Zustimmung des Autors oder des Verlages unzulässig. Das gilt insbesondere für Vervielfältigungen, Übersetzungen, Mikroverfilmungen und die Einspeicherung in und Verarbeitung durch elektronische Systeme.

1. Auflage 2013

All rights reserved. No part of this publication may be reproduced, stored in a retrieval system, or transmitted, in any form or by any means, electronic, mechanical, photocopying, recording, or otherwise, without the prior written permission of the Author or the Publishers.

1<sup>st</sup> Edition 2013

© 2013 by VVB LAUFERSWEILER VERLAG, Giessen  
Printed in Germany



*édition scientifique*  
**VVB LAUFERSWEILER VERLAG**

STAUFENBERGRING 15, D-35396 GIESSEN  
Tel: 0641-5599888 Fax: 0641-5599890  
email: [redaktion@doktorverlag.de](mailto:redaktion@doktorverlag.de)

**[www.doktorverlag.de](http://www.doktorverlag.de)**

**Die Expression von Adrenomedullin und Intermedin in  
humanen multipotenten Stromazellen sowie humanen  
Osteosarkomzellen und ihre Regulation  
unter Hypoxie**

**Inauguraldissertation**

zur Erlangung des Grades eines  
Doktors der Medizin  
des Fachbereiches Medizin  
der Justus-Liebig-Universität Gießen

vorgelegt von

**Katharina Münch**

aus Altenburg

Gießen 2012

Aus dem Labor für experimentelle Unfallchirurgie  
Direktor: Univ.-Prof. h.c. Dr. Dr. Dr. h.c. R. Schnettler  
des Universitätsklinikums Gießen und Marburg GmbH  
Standort Gießen

Gutachter: Frau Prof. Dr. K. S. Lips

Gutachter: Prof. Dr. M. Diener

Tag der Disputation: 19. 04. 2013

## **Erklärung**

Ich erkläre: Ich habe die vorgelegte Dissertation selbständig, ohne unerlaubte fremde Hilfe und nur mit den Hilfen angefertigt, die ich in der Dissertation angegeben habe. Alle Textstellen, die wörtlich oder sinngemäß aus veröffentlichten oder nicht veröffentlichten Schriften entnommen sind, und alle Angaben, die auf mündlichen Auskünften beruhen, sind als solche kenntlich gemacht. Bei den von mir durchgeführten und in der Dissertation erwähnten Untersuchungen habe ich die Grundsätze guter wissenschaftlicher Praxis, wie sie in der "Satzung der Justus-Liebig-Universität Gießen zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis" niedergelegt sind, eingehalten.

Meuselwitz, den 15. 11. 2012

Katharina Münch

## Inhaltsverzeichnis

Erklärung .....	I
1 Einleitung .....	1
1.1 Calcitoninpeptidfamilie .....	2
1.1.1 Calcitonin .....	3
1.1.2 CGRP .....	5
1.1.3 Amylin.....	6
1.1.4 Adrenomedullin.....	7
1.1.5 Intermedin .....	9
1.2 Rezeptoren .....	12
1.2.1 CR und CRLR .....	13
1.2.2 RAMPs .....	13
1.2.3 RCP .....	14
1.2.4 Wirkung der Calcitoninpeptidfamilie.....	14
1.2.5 Vorkommen der Rezeptorkomponenten .....	15
1.3 Osteosarkomzelllinie TE 85 .....	17
1.4 Humane multipotente Stromazellen .....	18
1.5 Der Knochenstoffwechsel unter dem Einfluss von Hypoxie.....	22
1.6 Fragestellung .....	24
2 Material und Methoden .....	25
2.1 Zellkultur .....	25
2.1.1 Die Osteosarkomzelllinie TE 85 (HOS).....	25
2.1.2 Die Bohrmehlzelllinien ZK 17 – ZK 21.....	26
2.1.3 Adipogene, osteogene und chondrogene Differenzierung .....	27
2.1.4 Zellkultivierung unter Hypoxie .....	31
2.2 Reverse-Transkriptase Polymerase-Ketten-Reaktion (RT-PCR) .....	33
2.2.1 RNA-Isolierung .....	33
2.2.2 cDNA-Synthese .....	34
2.2.3 Durchführung der RT-PCR .....	34
2.2.4 Auswertung der RT-PCR-Produkte .....	37
2.3 real-time RT-PCR.....	38
2.3.1 RNA-Isolierung .....	38

2.3.2	Messung der Konzentration und Reinheit der RNA .....	38
2.3.3	cDNA-Synthese.....	39
2.3.4	RT-PCR.....	39
2.3.5	Auswertung der RT-PCR .....	39
2.3.6	Etablierung der Primer und Bedingungen der real-time PCR.....	40
2.3.7	Durchführung der real-time PCR .....	41
2.3.8	Auswertung der real-time PCR .....	42
3	Ergebnisse .....	44
3.1	Expression von Adrenomedullin und Intermedin in der Osteosarkomzelllinie TE 85.. .....	44
3.1.1	Adrenomedullin.....	44
3.1.2	Intermedin .....	44
3.2	Expression von Adrenomedullin und Intermedin in multipotenten Stromazellen ....	45
3.2.1	Adrenomedullin.....	45
3.2.2	Intermedin .....	46
3.3	Expression von CRLR und RAMP 1-3 in der Osteosarkomzelllinie TE 85 .....	48
3.3.1	CRLR .....	48
3.3.2	RAMP 1.....	48
3.3.3	RAMP 2.....	48
3.3.4	RAMP 3.....	49
3.4	Expression von CRLR und RAMP 1-3 in multipotenten Stromazellen.....	50
3.4.1	CRLR .....	50
3.4.2	RAMP 1.....	51
3.4.3	RAMP 2.....	52
3.4.4	RAMP 3.....	54
3.5	real-time RT-PCR der multipotenten Stromazellen .....	60
3.5.1	Etablierung der Primer und Bedingungen der real-time PCR.....	60
3.5.2	Ergebnisse der real-time PCR .....	61
4	Diskussion.....	66
4.1	Adrenomedullin und Intermedin in der Osteosarkomzelllinie .....	
	TE 85 sowie multipotenten Stromazellen .....	66
4.1.1	Adrenomedullin.....	66
4.1.2	Intermedin .....	69

4.2	CRLR und RAMPs in der Osteosarkomzelllinie TE 85 sowie multipotenten Stromazellen .....	70
4.3	Regulation der Expression von Adrenomedullin und Intermedin unter Hypoxie .....	74
4.3.1	Adrenomedullin.....	74
4.3.2	Intermedin .....	74
4.4	Osteosarkomzellen und Bohrmehl.....	77
4.5	Die Rolle der Calcitoninpeptidfamilie im Knochenstoffwechsel.....	78
4.6	Ausblick.....	80
5	Zusammenfassung.....	82
6	Summary .....	84
7	Abbildungsverzeichnis .....	IV
8	Tabellenverzeichnis .....	VIII
9	Abkürzungsverzeichnis .....	IX
10	Literaturverzeichnis .....	XI
11	Danksagung .....	XXIII



# 1 Einleitung

Das Knochengewebe stellt ein hochspezialisiertes Zellsystem dar, welches sich vor allem durch seine Stützfunktion im menschlichen Organismus auszeichnet. Es dient nicht nur der Fortbewegung und dem Schutz wichtiger Organe, sondern besonders der Speicherung wichtiger Mineral- und Nährstoffe, wie beispielsweise Calcium, Magnesium und Phosphat.

Knochengewebe setzt sich aus einer organischen und einer mineralischen Matrix zusammen. Die organische Matrix wird zu 95% durch Kollagen I bestimmt, bei dem Knochenmineral dominieren Calcium-Hydroxyapatit-Kristalle (*Ajai et al. 2012*).

Histologisch können im Knochenmaterial drei Zelltypen voneinander unterschieden werden. Die Osteoblasten sind im Wesentlichen am Aufbau des Knochens beteiligt. Sie bilden das sogenannte Osteoid, welches sich aus einer Vielzahl von Osteozyten zusammensetzt. Osteozyten stellen ausgereifte Osteoblasten dar, die im Knochengewebe als Mechanosensoren agieren und somit den Knochenaufbau steuern sowie den Stoffaustausch im Gewebe sicherstellen. Für den Knochenabbau sind die Osteoklasten zuständig, in dem sie den mineralisierten Knochen resorbieren (*Ajai et al. 2012*).

Die Calcitoninpeptidfamilie zeigt eine wesentliche Beteiligung bei den Umbauvorgängen im Knochen und übt sowohl osteoproliferative als auch osteoresorptive Funktionen aus.

## 1.1 Calcitoninpeptidfamilie

Zur Familie der Calcitoninpeptide zählen Calcitonin, das Calcitonin-gene-related-peptide (CGRP), Amylin sowie Adrenomedullin und Intermedin, das auch als Adrenomedullin 2 bezeichnet wird.

Alle diese Polypeptide der Calcitoninpeptidfamilie weisen biologische und strukturelle Gemeinsamkeiten auf. So besitzen alle Mitglieder dieser Gruppe eine amino-terminale Ringstruktur aus sechs beziehungsweise sieben Aminosäuren, die über eine Disulfidbrücke zwischen zwei Cysteinen miteinander verbunden sind. Außerdem haben alle Peptide das amidierte Carboxylende gemeinsam (*Chang et al. 2004, Cornish 2001*).

Die Calcitoninpeptidfamilie entfaltet ihre Wirkung über G-Protein-gekoppelte Rezeptoren (siehe Kapitel 1.2).

Mit der Entdeckung des Calcitonins 1960 wurde der Grundstein für die weitere Erforschung der Gruppe der Calcitoninpeptide gelegt. In den folgenden 28 Jahren kamen die Peptide CGRP (1982) und Amylin (1988) hinzu. Alle drei Peptide wurden in den letzten Jahren intensiv auf verschiedenen Gebieten erforscht. Durch Untersuchungen in vitro und in vivo bei Mensch und Maus konnte bereits gezeigt werden, dass die Calcitoninpeptidfamilie ein breites Funktionsspektrum besitzt. So etwa in ihrer biologischen Aktivität und Wirkung auf Herz-Kreislauf-System, hormonelle Regulierung, Stoffwechsel und Knochenmetabolismus (siehe Kapitel 1.1.1 – 1.1.3).

Das Adrenomedullin, welches 1993 in der Nebenniere identifiziert werden konnte, und das 2003 entdeckte Intermedin, stellen die jüngsten Mitglieder der Calcitoninpeptidfamilie dar.

Diese beiden Peptide bedürfen vor allem im Hinblick auf den Knochenstoffwechsel noch intensiver Forschung und stellen deshalb das Hauptaugenmerk der Fragestellungen dieser Arbeit dar.



Lachscalitonin den Knochen am effektivsten an seinem Abbau hindert und länger im Organismus verweilt.

In vielen unterschiedlichen Bereichen des Organismus von Mensch und Tier konnten Rezeptoren für das Calcitonin entdeckt werden. So finden sich Calcitoninrezeptoren im Knochen, im Zentralnervensystem (ZNS), im Hoden, im Skelettmuskel, in Lymphozyten und in der Plazenta (*Gorn et al. 1992*).

In der Spermio- und Embryogenese besitzt das CT ebenfalls einen höheren Stellenwert. Die Spermienmotilität wird durch das Calcitonin gesteigert und es wurden signifikant mehr embryonale Implantationen im Uterusgewebe erzielt (*Ding et al. 1994, Fraioli et al. 1984*).

Im Blutkreislauf kommt es mit Hilfe des Calcitonins zu einer kurzfristigen und schnellen Senkung des Calcium- und Phosphatspiegels (*Chambers et al. 1982*). Dies wiederum bewirkt eine verminderte Knochenresorption durch Inhibition der Osteoklasten und einen Rückzug dieser durch Änderung des intrazellulären Calciumgehaltes. Stimulus hierfür ist vor allem eine hohe Calciumkonzentration im Blut (*Chambers et al. 1982*).

In der Niere bewirkt das Calcitonin eine erhöhte Ausscheidung von Calcium (*Pondel 2000*).

Durch Erniedrigung des Calciumspiegels im Blut verhindert Calcitonin den Knochenabbau indem es die Osteoklasten hemmt (*Lerner 2006*). Der genaue Vorgang, der zu diesem Pathomechanismus führt, ist derzeit noch nicht zu erklären.

Basierend auf seiner Wirkung bezüglich des Calciumgleichgewichtes, wird das Calcitonin bereits als Therapeutikum bei Osteoporose, Morbus Paget und Malignomen eingesetzt (*Copp et al. 1994*). So besagen die aktuellen Leitlinien zur Osteoporosebehandlung, dass das Calcitonin (aus Lachs gewonnen), als subkutane Injektion oder Nasenspray verabreicht, den Knochenabbau deutlich reduziert und signifikant weniger Wirbelkörperfrakturen bei osteoporotischen Frauen unter Calcitonintherapie auftreten (*Chesnut et al. 2000*).

Beim Morbus Paget handelt es sich um eine genetisch bedingte Verformung des Knochens auf Grund eines erhöhten Umbaus des Knochenmaterials, welche ein erhöhtes Frakturrisiko nach sich zieht. Der genaue Pathomechanismus dieser Knochenkrankheit ist noch nicht geklärt, allerdings wurde therapeutisch bewiesen,

dass die subkutane Injektion von Calcitonin den chronisch-progredienten Verlauf der Erkrankung verzögert (*Lam et al. 1998*).

Außerdem stellt das Calcitonin einen Tumormarker bei Schilddrüsenkarzinomen dar (*Clark et al. 2005*).

### 1.1.2 CGRP

CGRP ist ein aus 37 Aminosäuren bestehendes Peptid. Es wurde erstmals von Amara et al. 1982 beschrieben. Bei dem Versuch das Calcitonin alternativ zu spleißen, entstand ein ähnliches Peptid, das CGRP genannt wurde (*Amara et al. 1982*). Genau wie beim Calcitonin befindet sich die genetische Information für CGRP bei Mensch und Nagetier auf dem elften Chromosom (*Chang et al. 2004*). Derzeit sind zwei verschiedene Formen, das CGRP- $\alpha$  und das CGRP- $\beta$ , bekannt, welche sich lediglich in drei Aminosäuren voneinander unterscheiden (*Lerner 2006*). Hinsichtlich ihrer biologischen Aktivität konnten bis zum jetzigen Zeitpunkt noch keinerlei Unterschiede festgestellt werden. Beide Peptide stimulieren die Erweiterung der Blutgefäße, die Kontraktion des Herzens und tragen eine entscheidende Rolle bei der zentralen vaskulären Regulation. Im ZNS wurden CGRP-Rezeptoren auf Glia- und Schwannzellen gefunden. Das CGRP scheint außerdem, auf Grund seiner vasodilatatorischen Fähigkeiten, eine zentrale Rolle beim Pathomechanismus der Migräneerkrankung zu spielen. So zeigten Olesen et al., dass es durch einen CGRP-Antagonisten zur Blockade von Neurotransmittern am Trigeminalganglion kommt und dadurch Entzündungen an diesem Hirnnerv, die den Migräneschmerz verursachen, abgewendet werden konnten (*Olesen et al. 2004*).

Des Weiteren spielt das CGRP eine wesentliche Rolle bei der physiologischen Regulierung der Knochenformation auf Ebene der Osteoblastenaktivierung und Osteoklastenhemmung (*Burns et al. 2004*). Dabei wird in vivo und in vitro die Knochenresorption deutlich gesenkt, indem die Zellmembran der Osteoblasten cAMP-abhängig hyperpolarisiert wird und der Calciumspiegel in der Zelle steigt. Das CGRP ist gleichermaßen zu einer cAMP-unabhängigen Osteoblastendifferenzierung in der Lage. In den Osteosarkomzelllinien Saos 2, MG 63, und TE 85 (HOS) wurde das CGRP ebenfalls nachgewiesen und bewirkt dort in

gleicher Art und Weise wie in nativen Osteoblasten einen Anstieg des Calciumspiegels (*Burns et al. 2004, Togari et al. 1997*).

Im Rind, im Kaninchen und im Schwein wurde vor Kurzem das Calcitonin-receptor-stimulating-protein (CRSP) entdeckt, welches sich noch einmal in drei Subtypen klassifizieren lässt und eine 60%-ige Ähnlichkeit zum CGRP aufweist (*Katafuchi et al. 2002*). Wie alle Mitglieder der Calcitoninpeptidfamilie besitzen auch die Sybtypen des CRSP eine Ringstruktur im Molekül, gebildet durch eine Disulfidbrücke. CRSP 1 ist aus 38 AS aufgebaut, während CRSP 2 und CRSP 3 eine AS mehr aufweisen. Für CRSP gelang der Nachweis in der Niere, im ZNS und in der Schilddrüse von Nager, Hund und Schwein (*Granholm 2008, Katafuchi et al. 2009*). Des Weiteren konnten kleinere Mengen mRNA in Ovarien, Mittelhirn, Lunge, Leber und Dünndarm detektiert werden. Auch im Mensch konnte das CRSP kürzlich nachgewiesen werden (*Katafuchi et al. 2009*). Eine Klärung seiner Funktion sowie eine eindeutige Zuordnung seiner Effekte waren bis zu diesem Zeitpunkt jedoch noch nicht gelungen (*Katafuchi et al. 2002, 2009*). Erst 2011 gelang es der Arbeitsgruppe um Granholm zu zeigen, dass CRSP die Bildung von Osteoklasten hemmt und deren Aktivität reversibel herabfährt (*Granholm et al. 2011*). Außerdem zeigte sich in den Untersuchungen, dass unter Einfluss des CRSP die renale Rückresorption von Calcium unterdrückt wird und es im Gegenzug zu einer Hochregulation der Rezeptoren der Calcitoninpeptidfamilie kommt.

### 1.1.3 Amylin

Als Nebenprodukt von Insulin aus den  $\beta$ -Zellen der Langerhans-Inseln wurde Amylin im Pankreas von Typ II Diabetikern identifiziert (*Cooper et al. 1988*). Es besteht ebenfalls aus 37 Aminosäuren und trägt, wie das Calcitonin, seine Disulfidbrücke zwischen dem zweiten und siebten Cysteinrest (*Cornish et al. 2001*). Es liegt beim Menschen auf Chromosomen zwölf und hat – sowohl strukturell als auch funktionell – eine 45% Homologie mit CGRP (*Chang et al. 2004, Cornish et al. 2001*). Es wirkt hauptsächlich auf die Regulierung der Insulinausschüttung und somit auf die Steuerung des Blutzuckers (*Gebre-Medhin et al. 1998*). Da ein Zusammenhang zwischen Knochenmasse und Fettmasse in Säugern besteht, wurde

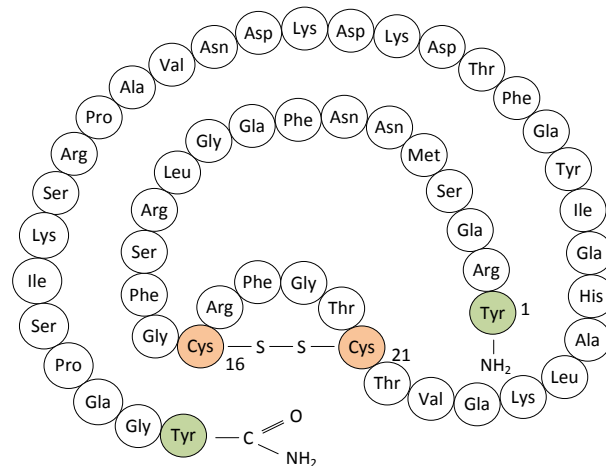
es in hoher Menge in adipösen Lebewesen nachgewiesen (*Cornish et al. 2001*). Ebenfalls erhöht scheint es bei Diabetikern und Tumorkranken mit einem Insulinom zu sein. Eine Hyperglykämie stimuliert seine Sekretion aus den  $\beta$ -Zellen, Hypoglykämien und die Anwesenheit von Leptin (Sättigungshormon) inhibieren die Ausschüttung (*Karlsson et al. 1998*). Ähnlich dem CGRP ruft das Amylin eine Dilatation auf Gefäßebene hervor (*Chang et al. 2004*).

Therapeutisch erfährt das Amylin bereits Anerkennung in der Behandlung des Diabetes mellitus. 2011 wurde eine lösliche Form eines Amylin-Analogons entwickelt und erfolgreich erprobt, welches zur Ausschüttung von Insulin in den  $\beta$ -Zellen führt (*Adeghate et al. 2011*).

Im Knochenstoffwechsel stimuliert es das Knochenwachstum, indem es die Osteoklastenmobilität durch einen Anstieg von cAMP hemmt und die Proliferation von Osteoblasten fördert (*Alam et al. 1993, Cornish et al. 1998*). Obendrein stimuliert Amylin die Proliferation von Chondrozyten und zeigt eine anabole Wirkung auf den Organismus (*Cornish et al. 2002*). Dacquin et al. konnten zeigen, dass Amylin-knockout-Mäuse einen typischen osteoporotischen Phänotyp aufweisen und durch erniedrigte Knochenmasse charakterisiert sind. Des Weiteren wurden auch kleine Mengen von Amylin-mRNA in Magen, Darm, Lunge und verschiedenen Neuronen des Nervensystems gefunden.

Im Gastrointestinaltrakt kann dem Amylin eine deutliche Motilitätshemmung zugeordnet werden (*Young 1997*). Auf die Niere wirkt es durch Regulierung der Calciumausschüttung und eine erhöhte Reninaktivität (*Blakely et al. 1997, Wookey et al. 1997*). Durch eine appetithemmende Wirkung, eine Senkung der Körpertemperatur und eine reduzierte Ausschüttung von Wachstumshormonen entfaltet es seine zentrale Wirkung (*Perry et al. 1997*). Wojcik et al. gelang es 2009 zu beweisen, dass die Konzentration von Amylin bei Frauen mit Anorexia nervosa deutlich reduziert ist. Bei dieser seelisch bedingten Essstörung kommt es in Folge dieses Mangels an Amylin zu einer Verminderung der Knochenmasse (*Wojcik et al. 2009*).

#### **1.1.4 Adrenomedullin**



**Abbildung 2:** Primärstruktur eines humanen Adrenomedullinmoleküls, bestehend aus 52 Aminosäuren. Die intramolekulare Ringstruktur befindet sich zwischen der 16. und 21. Aminosäure. Zwischen den zwei Cysteinen besteht eine kovalente Bindung, welche durch eine Disulfidbrücke hervorgerufen wird.

Adrenomedullin (AM) wurde 1993 erstmals von Kitamura et al. in der Nebennierenmark entdeckt (adrenal medulla) (Kitamura et al. 1993). Es ist aus 52 AS aufgebaut und hat im Gegensatz zu den anderen Mitgliedern der Calcitoninpeptidfamilie einen linearen Aminoterminal, bestehend aus 15 AS beim Menschen und einem amidierten Tyrosinrest am Carboxylende (Kitamura et al. 1993). Wie Calcitonin und CGRP ist auch AM auf dem Chromosom elf verschlüsselt (Chang et al. 2004). Seine Synthese erfolgt aus einem Vorläufermolekül, dem Präproadrenomedullin. Dieses Vorläufermolekül besteht aus 185 AS und einer 21 AS langen Signalsequenz am N-Terminus. Nach Abspaltung dieser Sequenz liegt das sogenannte Proadrenomedullin vor, welches nun noch eine Aminosäurelänge von 164 AS aufzuweisen hat. Nach vollständiger Genumschreibung entsteht daraus das biologisch aktive AM.

AM-mRNA scheint in allen Regionen des Körpers eine Rolle zu spielen und wird in vielen Geweben exprimiert. So etwa in Gefäßendothelien, Muskel- sowie Herzmuskelzellen, in Niere und Lunge, außerdem in Fibroblasten und Makrophagen. Des Weiteren wurden kleine Mengen AM in Neuronen, Gliazellen und retinale Pigmentgewebe nachgewiesen (Minamino et al. 2001). Es entfaltet seine Wirkung als Diuretikum, wirkt bronchodilatatorisch und scheint entscheidend für das kardiovaskuläre Gleichgewicht zu sein (Eto et al. 2001). So zeigt Myokardgewebe nach Infarkt effektivere und schnellere Regeneration nach Gabe von AM (Erhöhung der Herzrate und des kardialen Outputs) (Nicholls 2004). Massive kardiovaskuläre



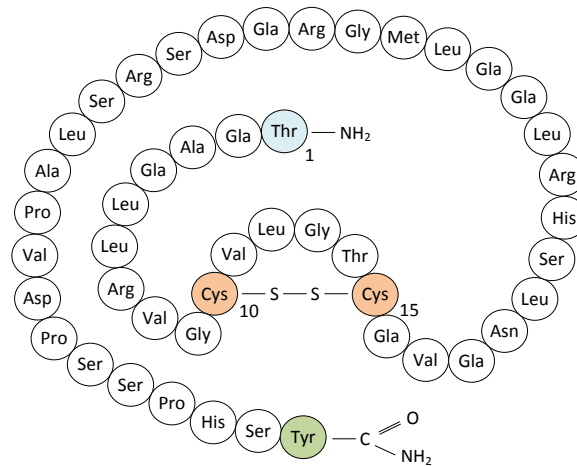
Fehlfunktionen machen AM-knockout-Mäusen ein Überleben unmöglich (*Caron et al. 2001*).

Wachstum, Hormonsekretion, Inflammation, Apoptose, Angiogenese sowie Carzinogenese werden von AM im menschlichen Körper reguliert (*Minamino et al. 2001*).

In einer Studie vermutet Lerner, dass AM nicht die Knochenresorption hemmt, wie alle anderen Peptide der Familie, sondern den Knochenstoffwechsel rein über Stimulation der Osteoblasten reguliert (*Lerner 2006*). Große Mengen von AM konnten bereits in Osteoblasten und Chondrozyten von Nagerembryonen und primären Osteoblasten ausgewachsener Ratten nachgewiesen werden (*Montuenga et al. 1997, Naot et al. 2001*). Im Knochenwachstum scheint es das potenteste Peptid aus der Calcitoninpeptidfamilie zu sein. So konnte gezeigt werden, dass es nach AM-Injektion in die Calvarien ausgewachsener Mäuse zu einer Zunahme des Knochenwachstums durch eine Vermehrung des Osteoids kam (*Cornish et al. 1997*). Eine erste Publikation zeigt, dass bei Patienten mit Rheumatoider Arthritis (RA) durch AM die Gelenkzerstörung verhindert und Knorpelschäden vorgebeugt wird. Diese Eigenschaft ist vermutlich auf Reduktion der inflammatorischen Zytokine (IL-1 und TNF- $\alpha$ ) zurückzuführen (*Yun et al. 2008*).

Nagaya et al. stellten die Vermutung auf, dass Hypoxie zu einer vermehrten Ausschüttung von AM und dies wiederum zu einer erhöhten Angiogeneserate führt (*Nagaya et al. 2005*). 2009 gelang der Arbeitsgruppe um Pfeil der Nachweis für diese Vermutung. So zeigte sich, dass es unter Sauerstoffmangel zu einer vermehrten Bildung von AM-mRNA in Lungenendothel, Herzmuskelzellen und neuronalen Zellen kommt (*Pfeil et. al 2009*).

### **1.1.5 Intermedin**



**Abbildung 3:** Primärstruktur eines humanen Intermedininmoleküls, bestehend aus 47 Aminosäuren. Zwischen der zehnten und 15. Aminosäure, beides Cystein, befindet sich eine intramolekulare Ringstruktur, die über eine Disulfidbrücke erzeugt wird.

Das auch als AM 2 bezeichnete Intermedin (IMD) stellt das jüngste Mitglied der Calcitoninpeptidfamilie dar. Es entsteht aus einer enzymatischen Vorform, dem Präprointermedin (Kandilci et al. 2006). IMD wurde 2003 von zwei Forschergruppen unabhängig voneinander als ein Peptid bestehend aus 47 AS im Kugelfisch identifiziert (Roh et al. 2004, Takei et al. 2004). Es teilt 28% Sequenzidentität mit AM und weniger als 20% Strukturgleichheit mit den restlichen Mitgliedern (Roh et al. 2004). Das menschliche IMD ist in seinem strukturellen Aufbau dem der Maus am ähnlichsten, von dem es sich nur in einer Aminosäure unterscheidet. Im Genom wird es beim Menschen auf Chromosom 22 verschlüsselt, im Mausgenom auf dem Chromosom 15 (Roh et al. 2004).

Die mRNA des IMD ist im Gastrointestinaltrakt, ZNS, Niere, Lunge, Gefäßendothel und im Thymus vorhanden (Chang et al. 2004, Roh et al. 2004). Es hemmt, ähnlich dem AM, die Magen- und Darm-Entleerung und setzt den Appetit herab (Chang et al. 2004, Roh et al. 2004, Takei et al. 2004).

Seine hypotensiven und vasodilatatorischen Effekte wurden bereits in menschlichem Gewebe und bei Nagern nachgewiesen. Hierbei bestätigten sich ebenfalls eine Reduzierung myokardialer Schäden nach Infarkt und die Komplikationsrate nach einem solchen Ereignis sank signifikant (besseres Outcome) (Yang et al. 2005).

Nach intracerebrovasculärer Verabreichung förderte IMD die Freisetzung von Prolaktin, Oxytocin, Vasopressin und verschiedenster Wachstumshormone (Fujisawa et al. 2004).

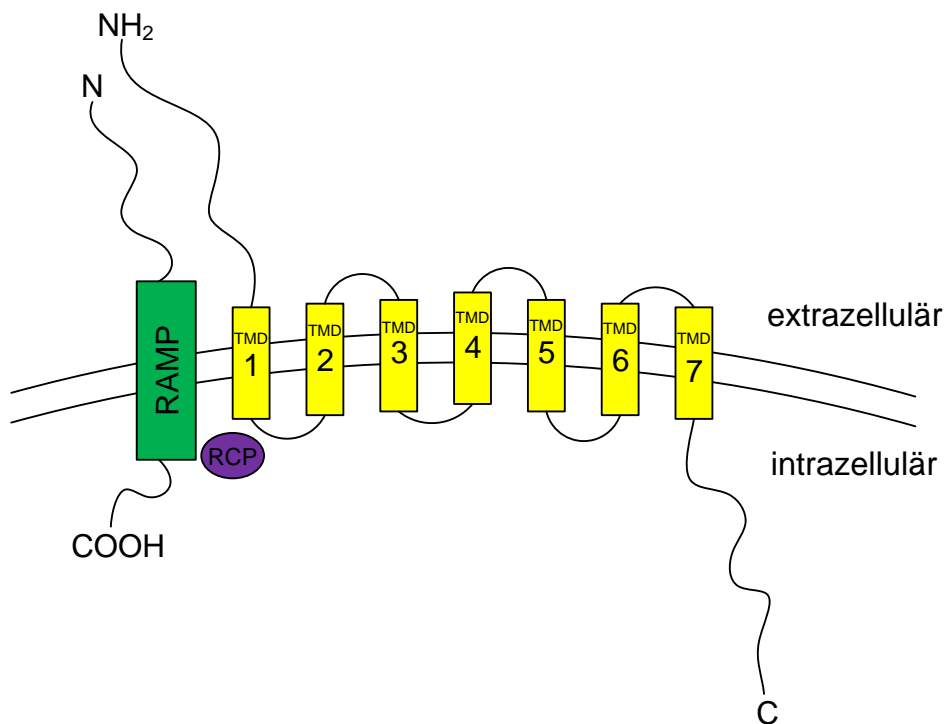
In einer Studie konnten Pfeil et al. zeigen, dass IMD die Permeabilität von Lungenendothel stabilisiert und somit eine Barrierefunktion sichergestellt wird (*Pfeil et al. 2009*). Pfeil et al. konnten weiterhin belegen, dass es unter Hypoxie zu einer Induktion von IMD im Lungenendothel kommt.

Der Nachweis im Knochen konnte erst 2011 erbracht werden. So entdeckten Granholm et al. das IMD in Knochengewebe von adulten Mäusen. Hinsichtlich seiner Funktion zeigte sich in dieser Studie, dass IMD die Resorption des Knochens durch direkte Hemmung der Osteoklasten herunterreguliert (*Granholm et al. 2011*). Außerdem scheint IMD auch reversibel die direkte Entstehung der Osteoklasten zu hemmen, so Granholm.

In humanem Knochenmaterial gelang bis zum jetzigen Zeitpunkt noch kein Nachweis für IMD, was einen Schwerpunkt in dieser Arbeit darstellen soll.

## 1.2 Rezeptoren

Die Calcitoninpeptidfamilie wirkt durch zwei G-Protein-gekoppelte Rezeptoren (*Gorn et al. 1992, Ponder 2000*): Zum Einen den Calcitoninrezeptor (CR) und zum Anderen den Calcitonin-Rezeptor-Like-Rezeptor (CRLR). Es hat sich gezeigt, dass diese Rezeptoren nicht als Monomere funktionieren, sondern aus mehreren, modulierenden Bestandteilen aufgebaut sind. Um eine Wirkung der Peptide zu ermöglichen, bedarf es bis zu drei verschiedener Faktoren: dem CR oder CRLR, der Rezeptor-Activity-Modifying-Proteins (RAMPs) und dem Rezeptor-Component-Protein (RCP).



**Abbildung 4:** Modell eines G-Protein-gekoppelten-Rezeptors mit sieben Transmembrandomänen, gekoppelt mit RAMP und RCP.

### 1.2.1 CR und CRLR

Der CR und der CRLR gehören beide zur Gruppe der G-Protein-gekoppelten Rezeptoren. Diese Klasse von Rezeptoren ist aus sieben Transmembrandomänen aufgebaut (*Gorn et al. 1992, Pondel 2000*). Diese Domänen durchspannen die Zellmembran und sind über extra- und intrazelluläre Schleifen miteinander verbunden (siehe Abbildung 4).

Der intrazelluläre C-Terminus dient der Bindung des G-Proteins. Diese Bindung ist notwendig, um den weiteren Signalweg auszulösen und den Rezeptor zu aktivieren (*Schöneberg et al. 1999*). Bei diesem Vorgang spielt das cAMP eine zentrale Rolle (*Bjurholm 1991*).

Am extrazellulären N-Terminus kann ein Ligand mit dem Rezeptor eine Bindung eingehen (zum Beispiel AM).

Die beiden Rezeptoren stellen die Basisstruktur des Rezeptorkomplexes dar. An sie können nun andere modulierende Faktoren, wie die RAMPs (fakultativ) und das RCP (obligat), binden. Erst wenn dieser Vorgang abgeschlossen ist, ist das Rezeptorheteromer komplett und funktionsfähig.

CR und CRLR weisen in ihrem strukturellen Aufbau eine 55%-ige Aminosäurengleichheit auf und teilen 88% Homologie in der Transmembrandomäne (*Lerner 2006*).

Lin et al. gelang es im Jahre 1991 als erste Arbeitsgruppe einen CR, bestehend aus 482 AS, zu klonieren (*Lin et al. 1991*). 1993 konnte auch der CRLR als neuer Rezeptor mit großer CR-Ähnlichkeit identisch vervielfältigt werden (*Naot et al. 2008*).

### 1.2.2 RAMPs

Ein modulierender Bestandteil der beiden Rezeptoren sind die Rezeptor-Activity-Modifying-Proteins (RAMPs). Die Gruppe der RAMPs, bestehend aus RAMP 1, RAMP 2 und RAMP 3, umfasst integrale Membranproteine mit einem langen extrazellulär gelegenen N-Terminus, einer Transmembrandomäne und einem kurzen, intrazellulären C-Terminus (siehe Abbildung 4). Sie werden als Signalpeptide

angesehen und bestimmen die Spezifität des Rezeptors (*Foord et al. 1999, McLatchie et al. 1998*). Der einzige Rezeptor, der bereits ohne Bindung der RAMPs vollständig wirken kann, ist der CR. Er bindet Calcitonin ohne Anwesenheit eines RAMP (*Muff et al. 1999*).

Die genetischen Informationen der RAMPs liegen auf Chromosomen zwei (RAMP 1), 17 (RAMP 2) und sieben (RAMP 3). Bei Mensch und Nagetier umfassen sie eine unterschiedliche Länge. Die Mäuse-RAMPs bestehen aus 148 AS (RAMP 1), 189 AS (RAMP 2) und 147 AS (RAMP 3). Beim Mensch beträgt die Länge des RAMP 1 und RAMP 3 jeweils 148 AS, die des RAMP 2 175 AS (*Bühlmann et al. 1999*). McLatchie et al. gelang es erstmals 1998 RAMPs zu klonieren (*McLatchie et al. 1998*).

### 1.2.3 RCP

Das RCP stellt ein Protein dar, das aus 148 AS aufgebaut und intrazellulär lokalisiert ist (*Prado et al. 2002*). Prado et al. gelang es, RCPs von Maus, Kaninchen und Mensch zu klonieren und eine 82%-ige Homologie zwischen den drei Proteinen nachzuweisen (*Prado et al. 2002*).

Die genaue Bedeutung des RCP ist noch ungeklärt. Höchstwahrscheinlich ist es für die Aktivierung der Signaltransduktionskette des G-Proteins mit der Adenylatzyklase zuständig (*Arulmani et al. 2004*).

Das RCP ist immer Bestandteil des CRLR (*Prado et al. 2002*). Fehlt das RCP, ist es den Proteinen der Calcitoninpeptidfamilie nicht möglich, eine Bindung mit dem Rezeptor einzugehen (*Evans et al. 2000*).

Seine Zugehörigkeit zum CR wird diskutiert, aber ist noch nicht ausreichend belegt (*Dumont et al. 2004*).

### 1.2.4 Wirkung der Calcitoninpeptidfamilie

Werden die Rezeptoren mit den verschiedenen RAMPs kombiniert, entstehen unterschiedliche Affinitäten zu den Peptiden der Calcitoninpeptidfamilie (siehe Tabelle 1). Eine Wirkung von Amylin ist zu erkennen, wenn sich der CR mit einem

der RAMPs verbindet. Dabei ist es als unspezifisch anzusehen, welches RAMP die Verbindung mit dem Rezeptor eingeht (*Chang et al. 2004*). Auch das erst kürzlich entdeckte CRSP scheint seine Wirkung durch den CR zu verbreiten.

CGRP, Adrenomedullin und Intermedin arbeiten bevorzugt über den CRLR. In Kombination mit RAMP 1 wird überwiegend CGRP gebunden. RAMP 2 und RAMP 3 bewirken eine Affinität zum CRLR mit AM. Beim Intermedin konnte bisher vermutet werden, dass es bevorzugt eine Bindung mit einem CRLR in Kombination von RAMP 1 und RAMP 3 eingeht (*Chang et al. 2004, Roh et al. 2004*). Allerdings ist nach Roh et al. die Bindung geringer Mengen von Intermedin an CRLR in Kombination mit RAMP 2 nicht auszuschließen (*Roh et al. 2004*).

### 1.2.5 Vorkommen der Rezeptorkomponenten

Die Rezeptoren spielen in einer Vielzahl von Gewebearten im tierischen und menschlichen Körper eine Rolle. Die mRNA der Rezeptoren (CR und CRLR) sowie die der RAMPs werden im ZNS, im kardiovaskulären System, in der Skelettmuskulatur, in der Niere, im Verdauungstrakt, im Uterus und in der Lunge nachgewiesen (*Gorn et al. 1992, McLatchie et al. 1998, Qi et al. 2008*).

In einer ersten Arbeit an primären humanen Osteoblasten in vitro wurde CRLR, RAMP 1 und RAMP 2 nachgewiesen (*Lerner 2006, Naot et al. 2008*).

Lerner konnte 2006 in einer Studie feststellen, dass viel CR-mRNA in Osteoklasten zu identifizieren ist (*Lerner 2006*). Vom CR konnten im Laufe der Zeit zahlreiche Isoformen gefunden, doch deren unterschiedliche Funktionen nicht geklärt werden. In den beschriebenen Osteoklasten sind überwiegend die Isoformen CR 1a und CR 1b charakteristisch (*Pondel 2000*).

Auch CRLR konnte in dieser Studie in den Osteoklasten in geringer Form ausfindig gemacht werden. Für RAMP 2 gelang 2004 ebenfalls ein Nachweis für das Vorliegen in Osteoklasten, für die zwei weiteren RAMPs blieb ein Nachweis allerdings aus (*Nakamura et al. 2004*). Untersuchungen an humanen Osteosarkomzellen wurden in der Vergangenheit ebenfalls unternommen. Die stattgefundenen Studien belegten ein Vorhandensein von mRNA des CRLR in den Zelllinien MG 63, Saos und TE 85 (*Burns et al. 2004, Togari et al. 1997*). Des Weiteren konnte in MG 63 auch RAMP 1 charakterisiert werden (*Burns et al. 2004*).

Rezeptor	Rezeptorkomponenten	Liganden/ Peptide
CR	CR	Calcitonin, CRSP
AMY <sub>1</sub>	CR + RAMP 1	Amylin
AMY <sub>2</sub>	CR + RAMP 2	Amylin
AMY <sub>3</sub>	CR + RAMP 3	Amylin
CGRP <sub>1</sub>	CRLR + RAMP 1	CGRP > IMD = AM
AM <sub>1</sub>	CRLR + RAMP 2	AM > IMD = CGRP
AM <sub>2</sub>	CRLR + RAMP 3	AM > IMD > CGRP

**Tabelle 1:** Darstellung der Rezeptoren mit ihren einzelnen Rezeptorkomponenten und deren Liganden.



### 1.3 Osteosarkomzelllinie TE 85

Die Zelllinie TE 85, die auch als HOS TE 85 bezeichnet wird, bildet mit den zwei Zelllinien Saos und MG 63 die Gruppe der humanen Osteosarkomzellen. TE 85 wurde das erste Mal 1971 von McAllister et al. beschrieben und kultiviert (*McAllister et al. 1971*). Sie besitzt einen ähnlichen Phänotyp wie die ausgereiften Osteoblasten und hält auch nach unzähligen Passagierzyklen ihre funktionellen Eigenschaften aufrecht (*Owen et al. 1990, Siggelkow et al. 2002*).

Osteosarkomzelllinien werden bevorzugt für experimentelle Analysen eingesetzt, da sie eine kurze Verdopplungszeit und rasches Zellwachstum besitzen, sowie eine relativ anspruchslose Kultivierung erfordern. Mit einer Verdopplungszeit von 21,6 Stunden differenziert sich TE 85 unter den Sarkomzelllinien am zügigsten (*Clover et al. 1994*). Allerdings zeigen Osteosarkomzellen nicht alle Eigenschaften gesunder Knochenzellen. So durchlaufen diese beispielsweise nicht die kompletten Differenzierungsphasen und unterscheiden sich somit von den physiologischen Eigenschaften normaler Osteoblasten (*Siggelkow et al. 1998*). Außerdem sind Osteosarkomzellen dadurch gekennzeichnet, dass sie die Kontrolle über ihr Zellwachstum verloren haben und zu einer deutlichen Entartungstendenz neigen.

## 1.4 Humane multipotente Stromazellen

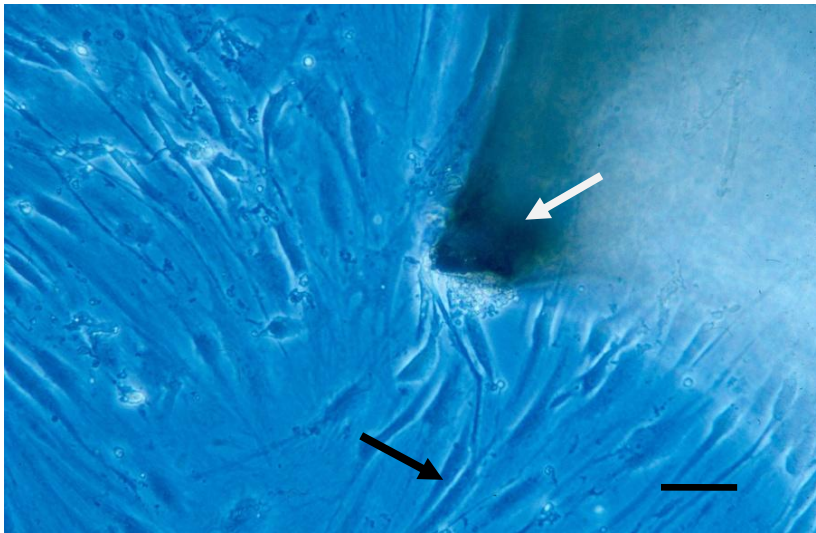
Beim Aufbohren von Knochen (zum Beispiel im Rahmen der Osteosynthese) entsteht als Abfallprodukt Bohrmehl (siehe Abbildung 5). Nach Gewinnung dieses Zellmaterials erfolgt die Vermehrung der Zellen *in vitro* sowie das Anzüchten durch spezielle Nährmedien (siehe 2.1.2) (*Trinkaus et al. 2005*). Einige Studien konnten in der Vergangenheit zeigen, dass es sich bei diesem Material um eine Quelle vitaler Zellen handelt, bestehend aus osteoblastären Zellen und multipotenten Stromazellen (MSC) (*Colter et al. 2001, Hung et al. 2002, Trinkaus et al. 2005*). Diese MSC können durch spezifische Antigene identifiziert werden, die auf ihrer Oberfläche exprimiert werden. Ein solches Oberflächenantigen stellt das CD90 dar.

In bereits vorliegenden Publikationen werden im Bohrmaterial drei verschiedene Zelltypen nach Anzüchtung und Differenzierung beschrieben. Die „rapidly self renewing cell“ 1 (RS1), die „rapidly self renewing cell“ 2 (RS2) und die reife, mesenchymale Stammzelle repräsentieren die drei Zellmorphologien. Die RS1 (siehe Abbildung 6) wird als „kleine, polyklonale bis runde Zelle etwa von Zellkerngröße“ beschrieben. Groß und mit „spindelförmigen Ausläufern“ hingegen erscheint die RS2 (siehe Abbildung 7). Die ausgereiften Zellen (siehe Abbildung 8) sind charakterisiert durch einen großen, flachen Zellkörper von bis zu 400 µm Größe (*Colter et al. 2001, Trinkaus et al. 2005*). Es wird vermutet, dass es sich bei den RS1 und RS2 Zellen um Vorläuferzellen, so genannte Progenitorzellen, der MSCs handelt.

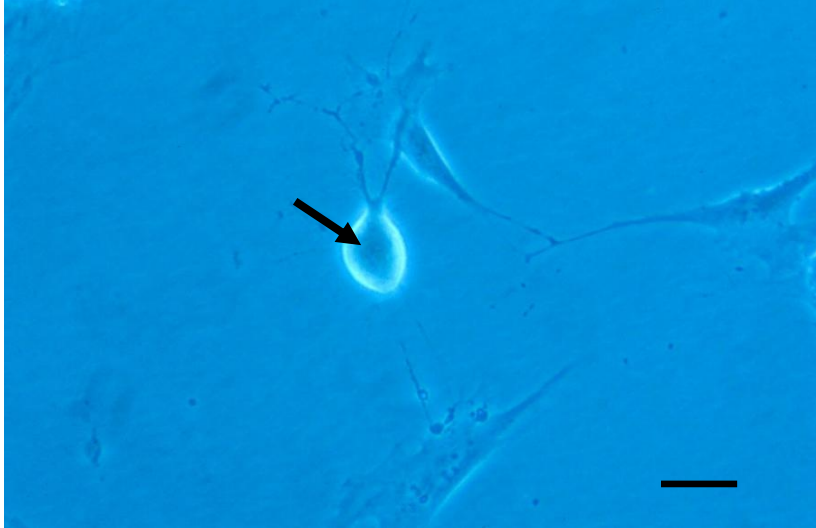
Das Vermehrungs- und Differenzierungspotential dieser Stammzellen des Bohrmehls in unterschiedlichste Zelltypen, wie adipogene, osteogene, chondrogene Zellen, ist ein Indiz, dass es sich um mesenchymale Stammzellen handelt (*Colter et al. 2001*). Außerdem existieren Hinweise, dass sich die MSCs gleichermaßen in neuronale, hepatische, kardiomuskuläre und mesangiale Gewebetypen entwickeln können (*Colter et al. 2001, Ito et al. 2001, Petersen et al. 1999, Strauer et al. 2002*). Auf Grund dieser Tatsache besitzen die MSCs ein großes therapeutisches Potenzial, welches bereits bei osteoinduktiven Knochenersatzmaterialien eingesetzt wird (*Trinkaus et al. 2005*). In tierexperimentellen Studien konnte ihnen gleichermaßen eine osteoinduktive Wirkung nachgewiesen werden (*Hoegel et al. 2004*). So konnten beispielsweise Hoegel et al. zeigen, dass in 63 von 72 Bohrmehlproben, die aus

Schafen entnommen wurden, vitale Zellen vorhanden waren und somit den Bohrvorgang überlebt hatten (*Hoegel et al. 2004*).

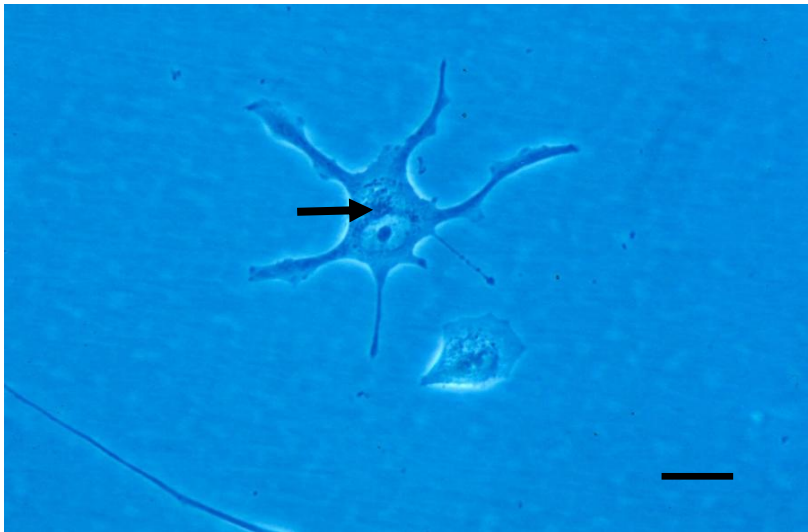
Somit scheint das Bohrmehl eine zukunftsorientierende, vielversprechende Methode in der autogenen Zelltherapie im Rahmen des „Tissue-Engeneering“ darzustellen. Bei diesem Prinzip handelt es sich um eine Methode der Geweberekonstruktion, bei der dem Patienten körpereigenes, gesundes Gewebe entnommen wird. Nach Kultivierung und Aufbereitung dieser lebenden Zellen unter Laborbedingungen kann das vermehrte Gewebe an defekte Stellen des Körpers wieder eingepflanzt werden und so die verlorengegangene Gewebefunktion ersetzen oder wiederherstellen.



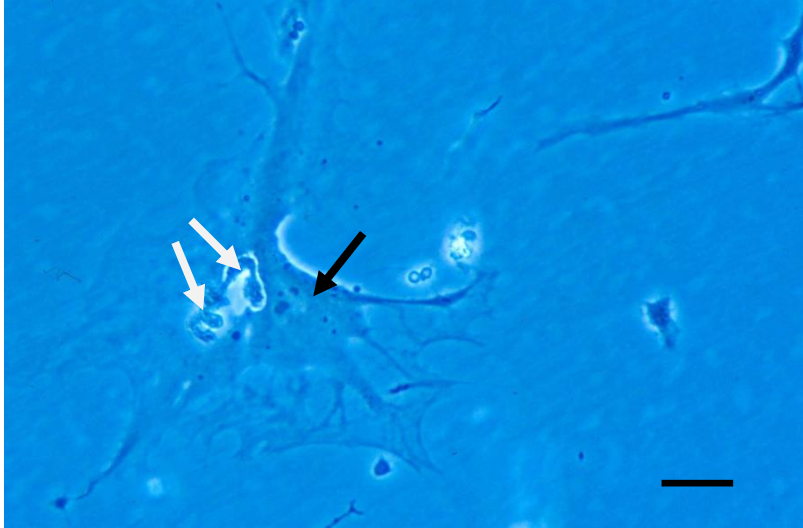
**Abbildung 5:** Knochenfragment (weißer Pfeil) im Bohrmehl mit auswachsenden Zellen (schwarzer Pfeil) nach Anzüchtung und Inkubation im Medium, Maßstab: 100 µm, (*Trinkaus et al. 2007*).



**Abbildung 6:** *RS1-Zelle (schwarzer Pfeil) im Bohrmaterial, gekennzeichnet durch den hohen Kernanteil, Maßstab: 25  $\mu\text{m}$ , (Trinkaus et al. 2007).*



**Abbildung 7:** *RS2-Zelle (schwarzer Pfeil) im Bohrmaterial, gekennzeichnet durch die spindelförmigen Zellausläufer, Maßstab: 50  $\mu\text{m}$ , (Trinkaus et al. 2007).*



**Abbildung 8:** Reife, mesenchymale Stammzelle (schwarzer Pfeil) im Bohrmaterial, gekennzeichnet durch den großen, flächigen Zellkörper und mehrere Zellkerne (weiße Pfeile), Maßstab: 50  $\mu\text{m}$ , (Trinkaus et al. 2007).

## 1.5 Der Knochenstoffwechsel unter dem Einfluss von Hypoxie

Unter dem Begriff Hypoxie wird eine mangelnde Versorgung des Gewebes mit Sauerstoff verstanden. Der Sauerstofflieferant im menschlichen Organismus stellt das Hämoglobin im Blutkreislauf dar. Im Rahmen von Frakturen kann es durch Verletzungen der Blutgefäße zu einer Mangeldurchblutung kommen, die eine Hypoxie des umliegenden Weichteilgewebes und des Knochens nach sich zieht. Auch in Tumorgewebe, bei lokalen Entzündungen, unter Diabetes mellitus oder in osteoporotischem Material kann es zu solch einer Minderversorgung mit Sauerstoff und Nährstoffen kommen (*Lewis et al. 1999*). Im Rahmen der folgenden Entzündungsreaktion kommt es nun zur Einwanderung von Entzündungsmediatoren, wie Interleukin, die wiederum die Heilung fördern (*Kolar et al. 2011*).

Von den ursprünglich 21% Sauerstoff in der physiologischen Einatemluft gelangen zirka 12% in den Blutkreislauf und zirka 6,6% in das menschliche Knochenmark (*Utting et al. 2006*). Kommt es nun zu einer Unterbrechung der Blutzufuhr durch oben genannte Gründe, so wurden Werte von gerade einmal 0,8% Sauerstoff (Fraktur beim Kaninchen) ermittelt (*Utting et al. 2006*).

Diese Hypoxie verursacht eine reversible Hemmung der Osteoblasten, was wiederum die Knochenbildung stagnieren lässt (*Utting et al. 2006, 2010*). Diese Aussage erklärt den Verlust von Knochenmaterial im Rahmen von Entzündungen, Tumoren und Frakturen des Knochens.

Ergänzend zu dieser Studie zeigten Arnett et al., dass Hypoxie im Knochengewebe den Reiz zur Stimulation der Osteoklasten setzt, was ebenfalls zur Reduktion der Knochenmasse führt (*Arnett et al. 2003*).

Allerdings konnten Steinbrech et al. auch zeigen, dass es nicht nur zu einem Verlust der Knochenmasse unter Hypoxie kommt, sondern dass dieser Zustand auch den Reiz zur Ausschüttung eines Gewebewachstumsfaktors, dem vascular-endothelial-growth-factor (VEGF), setzt (*Steinbrech et al. 2000*). Dieser Faktor wiederum fördert die Neovaskularisation sowie Angiogenese im Frakturbereich, trägt damit zur Heilung bei und fördert das Knochenwachstum.

Nicht nur für VEGF konnte bewiesen werden, dass es unter Hypoxie hochreguliert wird, sondern auch für Mitglieder der Calcitoninpeptidfamilie.

So zeigten Pfeil et. al., dass sowohl AM als auch IMD unter Sauerstoffmangel vermehrt nachweisbar sind. Bei den dabei untersuchten Gewebearten handelt es sich um Kardiomyozyten, Fibroblasten, Lungenendothel und Neuroblastomzellen (*Pfeil et al. 2009*).

Mit Hilfe dieser Erkenntnisse könnte nun vermutet werden, dass auch AM und IMD unter den Bedingungen einer Hypoxie zur Neovaskularisation in frakturiertem Knochengewebe beitragen und somit die Knochenheilung sowie das Knochenwachstum fördern.

Dieser Vermutung soll in der vorliegenden Arbeit genauer nachgegangen werden.

## 1.6 Fragestellung

Die Calcitoninpeptidfamilie ist im physiologischen Stoffwechsel weit verbreitet und übt kardiovaskuläre, renale, pulmonale, zentralnervöse und auch endokrine Funktionen aus. Ebenfalls konnte bewiesen werden, dass das Calcitonin direkten Einfluss auf das Knochenwachstum nimmt. So stellt es schon jetzt eine therapeutische Möglichkeit bei Osteoporose oder Morbus Paget dar. Allerdings zeigt sich auch, dass bisher noch kein sicheres Therapiekonzept zur Behandlung dieses Knochenschwundes gefunden werden konnte und weiterhin die Zahl an osteoporosekranken Patienten weltweit zunimmt.

Bei den Proteinen dieser Gruppe konnten teilweise osteoproliferative Eigenschaften, aber auch osteoresorptive Komponenten entdeckt werden. Diesbezüglich scheinen CGRP, Amylin und Adrenomedullin Aktivatoren der Knochenbildung zu sein, welche das Wachstum der Knochensubstanz begünstigen.

Über Intermedin - als jüngstes Mitglied der Calcitonin-Familie - und seine Wirkungsweise auf das Knochenwachstum liegen bis zum jetzigen Zeitpunkt nur wenige Erkenntnisse vor.

In Anbetracht dieser Hintergründe sollen in der vorliegenden Arbeit folgende Fragen genauer erörtert werden:

1. Werden Adrenomedullin und Intermedin in der humanen Osteosarkomzelllinie TE 85 und in humanen multipotenten Stromazellen exprimiert?
2. Werden der Rezeptor CRLR und die modulierenden Membranproteine der RAMP-Familie in der humanen Osteosarkomzelllinie TE 85 und in humanen multipotenten Stromazellen exprimiert?
3. Wie wirkt sich Hypoxie auf die Expression von Adrenomedullin und Intermedin in humanen multipotenten Stromazellen aus?

Möglicherweise stellen diese zwei neuen Familienmitglieder der Calcitoninpeptidfamilie, das IMD und das AM, ein ähnlich potentes Therapeutikum im Stoffwechsel des Knochens dar und eröffnen zukunftsorientierte Möglichkeiten in der Behandlung von Knochenwachstumsstörungen sowie der Heilung von Frakturen.



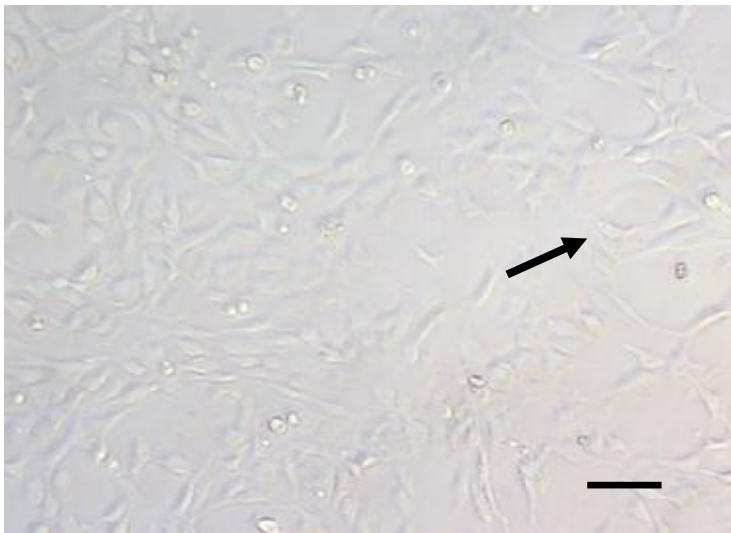
## 2 Material und Methoden

### 2.1 Zellkultur

Für die Untersuchungen wurden eine humane Osteosarkomzelllinie TE 85 (HOS) und primäre Zellkulturen (ZK 17 – ZK 21) aus humanem Bohrmehl verwendet.

Die TE 85-Zelllinie wurde von der Zellbank MIISA, Milano (Istituto Nazionale per lo Studio e la Cura dei Tumori) bezogen. Die primären Kulturen aus humanem Bohrmehl wurden im Labor für experimentelle Unfallchirurgie der Justus-Liebig-Universität Gießen angelegt, undifferenziert untersucht und in Osteoblasten, Chondroblasten und Adipozyten differenziert.

#### 2.1.1 Die Osteosarkomzelllinie TE 85 (HOS)



**Abbildung 9:** Osteosarkomzelllinie TE 85, schwarzer Pfeil = einzelne Osteosarkomzelle, Maßstab: 250  $\mu\text{m}$ .

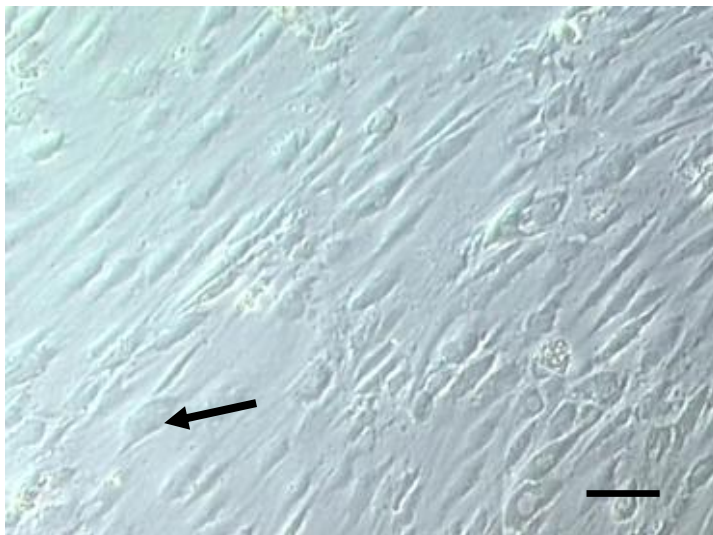
Diese humane Osteosarkomzelllinie stammt von einem 13-jährigen, kaukasischen Mädchen.

Die Zellen wurden in Zellkulturflaschen (25 cm<sup>2</sup>, Nunc, Wiesbaden, Deutschland) bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub>-Atmosphäre in einem Brutschrank (Typ BB 16 Heraeus, Hanau, Deutschland) kultiviert und mit Eagle's Minimum Essential Medium (PAA Laboratories, Cölbe, Deutschland) genährt. Dem Medium wurde 10% fetales Kälberserum (FKS-gold, Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland) zugesetzt.

Drei- bis viermal pro Woche erfolgten die mikroskopische Kontrolle und der Mediumwechsel. Zum Vermehren der Zellen wurden die Zellen trypsinisiert (Trypsin-EDTA, Invitrogen) und auf mehrere Kulturflaschen verteilt.

Überflüssige Zellen wurden in 5%-igem Dimethylsulfoxid (DMSO, Serva, Heidelberg, Deutschland) im Medium langsam (1°C pro Minute) im Alkoholkühler (Nalgene, Neerijse, Belgien) auf -80°C herunter gekühlt und in flüssigem Stickstoff gelagert. Zur weiteren Verwendung wurden die Zellen aufgetaut und erneut angezüchtet.

### 2.1.2 Die Bohrmehzelllinien ZK 17 – ZK 21



**Abbildung 10:** Zelllinie ZK 21 undifferenziert, die Zellen erscheinen konfluent und sind in diesem Stadium bereit zum Passagieren, schwarzer Pfeil = einzelne Zelle im Bohrmehlmaterial, Maßstab: 100 µm.

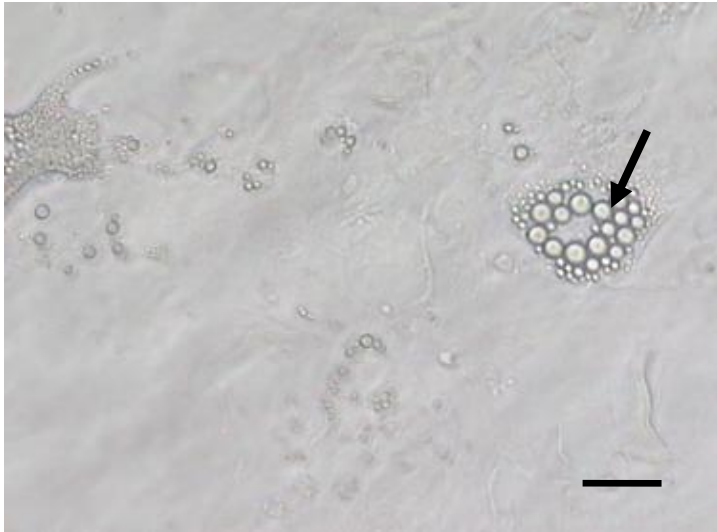
Das Bohrmehl stammt von fünf männlichen Patienten unterschiedlichen Alters (Geburtsjahrgänge von 1910 bis 1985), die sich auf Grund der Versorgung von

Femur- und Tibiafrakturen einer aufgebohrten Marknagelosteosynthese unterziehen mussten. Nach Genehmigung der Ethikkommission (AZ: 106/06) wurde bei diesem Eingriff das anfallende Bohrmehl gewonnen und umgehend in F12K-Medium (Invitrogen) mit 20% FKS (FKS-ES, PAA Laboratories), 0,05 U/ml Penicillin (Invitrogen) und 0,05 µg/ml Streptomycin (Invitrogen) überführt. Nachdem die Proben zwei Wochen bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> kultiviert wurden, wurde der FKS-Gehalt im F12K-Medium auf 15% reduziert und die Zellen verblieben bis zur Konfluenz in diesem Medium. Je nach Mediumverbrauch (farbabhängig) erfolgte alle zwei bis drei Tage ein Wechsel des Mediums. Abhängig von der Wachstumsgeschwindigkeit und der Zelldichte wurden die Zellkulturen zirka alle zehn Tage passagiert. Nicht benötigte Zellen wurden in 10%-igem DMSO im F12K-Medium langsam (1°C pro Minute) im mit Isopropanol gefüllten Alkoholkühler auf -80°C heruntergekühlt und auf flüssigem Stickstoff gelagert, bis sie zur weiteren Verwendung aufgetaut und erneut angezüchtet wurden.

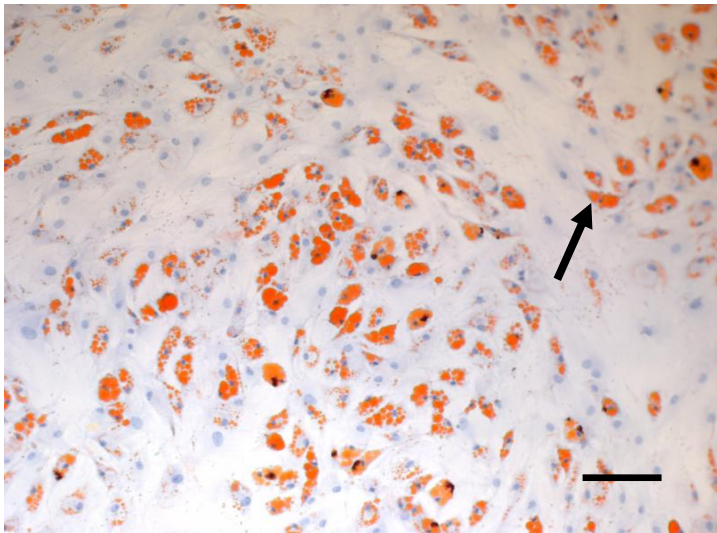
### **2.1.3 Adipogene, osteogene und chondrogene Differenzierung**

Zur Differenzierung der aus Bohrmehl kultivierten Zellen, wurden die Zellen in verschiedene Differenzierungsmedien überführt. Das adipogene Induktions-Medium wurde aus DMEM-high Glucose mit L-Glutamin (PAA Laboratories), 1 µM Dexamethason (Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland), 0,2 mM Indomethacin (Synopharm, Barsbüttel, Deutschland), 0,01 mg/ml Insulin (Aventis Pharma, Frankfurt/Main, Deutschland), 0,5 mM 3-Isobutyl-1-methyl-xanthin (Sigma-Aldrich), 10% FKS und 100 U/ml Penicillin (Invitrogen) sowie 100 µg/ml Streptomycin (Invitrogen) hergestellt. Nach drei bis vier Tagen wurde das Induktions-Medium durch Adipozyten-Kultur-Medium, bestehend aus DMEM-high Glucose mit L-Glutamin, 0,01 mg/ml Insulin, 10% FKS und 100 U/ml Penicillin sowie 100 µg/ml Streptomycin, ersetzt. Nun erfolgten alle drei bis vier Tage ein Wechsel der adipogenen Medien und eine mikroskopische Kontrolle. Während dieser Zeit wurden die Zellkulturen im Brutschrank bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> aufbewahrt. Bis zur endgültigen Differenzierung in adipogene Zellen vergingen etwa drei bis vier Wochen. Innerhalb dieses Zeitraums konnte unter dem Mikroskop beobachtet werden, dass sich in den Kulturflaschen Fetttropfchen formten. Nach

zirka einem Monat waren in fast jeder Zelle Fettvakuolen zu erkennen und die Phase der Differenzierung war somit abgeschlossen (siehe Abbildung 11).



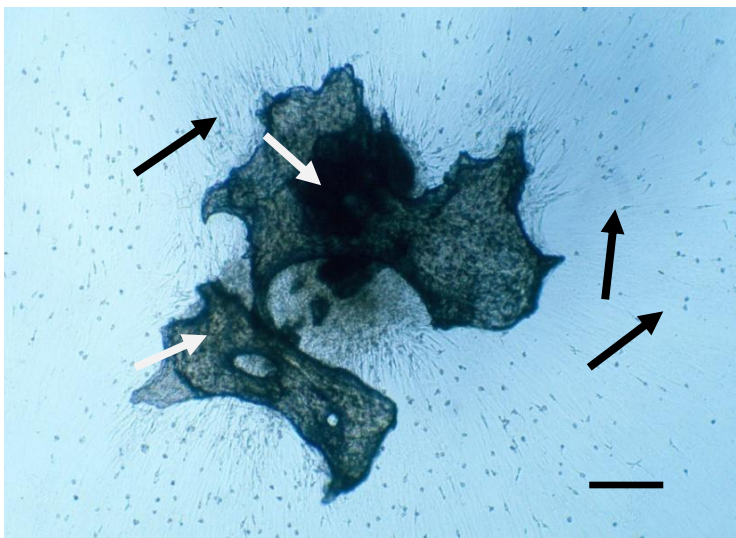
**Abbildung 11:** Zelllinie ZK 18 adipogen differenziert, plurivakuoläre Adipozyten treten nach vierwöchiger Inkubation im adipogenen Medium in Erscheinung (schwarzer Pfeil), Maßstab: 50  $\mu\text{m}$ .



**Abbildung 12:** Zelllinie ZK 20 adipogen differenziert, Oil-Red-O-Färbung der adipogenen Vakuolen (schwarzer Pfeil), Maßstab: 50  $\mu\text{m}$ , (Trinkaus et al. 2007).

Zur osteogenen Differenzierung wurde ein Medium aus DMEM-low Glucose mit L-Glutamin (PAA Laboratories), 10% FKS, 0,1  $\mu\text{M}$  Dexamethason, 0,05 mM Ascorbinsäure-2-Phosphat (Sigma-Aldrich), 10 mM  $\beta$ -Glycerolphosphat (Sigma-

Aldrich), 100 U/ml Penicillin und 100 µg/ml Streptomycin hergestellt. Alle drei bis vier Tage erfolgte der Wechsel des osteogenen Nährmediums und die Zellen wurden bei 5% CO<sub>2</sub> und 37°C kontinuierlich bebrütet und mikroskopisch kontrolliert. Nach etwa zwei Wochen bildete sich erstes Knochenmineral in den Zellkulturflaschen. Die Differenzierung der einzelnen Zellen war etwa nach vier Wochen abgeschlossen und es war mikroskopisch zu beobachten, dass sich an den meisten Zellen Kristalle angelagert hatten.



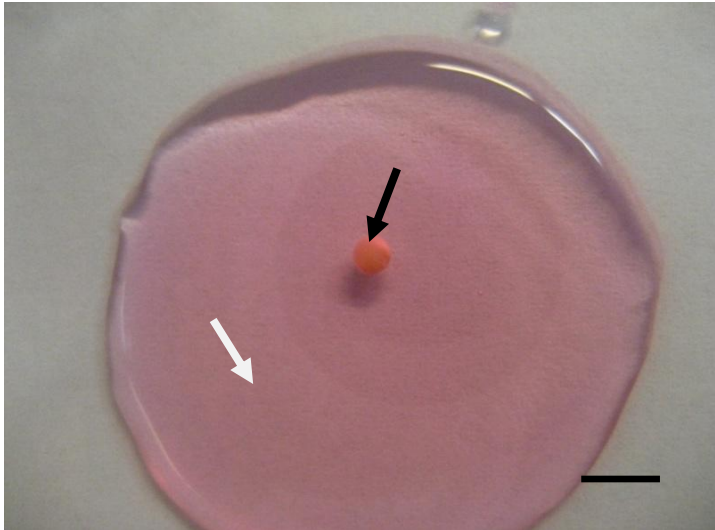
**Abbildung 13:** Aus einem Knochenfragment (weiße Pfeile) des Bohrmehls auswachsende undifferenzierte Zellen (schwarze Pfeile), 14 Tage nach Inkubation der Zellen im Standardmedium, Maßstab: 250 µm, (Trinkaus et al. 2007).





**Abbildung 14:** Zelllinie ZK 17 osteogen differenziert, 30 Tage im osteogenen Medium inkubiert, Mineral stellt sich von Kossa gefärbt schwarz dar (weiße Pfeile), Maßstab: 50  $\mu\text{m}$ , (Trinkaus et al. 2007).

Um eine chondrogene Differenzierung der Zellkulturen zu erreichen, wurden durch Zentrifugation (150 g für fünf Minuten) Zellpellets ( $2,5 \times 10^5$  Zellen) geformt und mit je 1 ml chondrogenem Medium versetzt, welches sich folgendermaßen zusammensetzte: 0,1  $\mu\text{M}$  Dexamethason, 35  $\mu\text{g/ml}$  Ascorbinsäure, 1 mM Pyruvat (Sigma-Aldrich) und 50 ng/ml bone-morphogenetic-protein-2 (BMP-2, R&D Systems, Wiesbaden, Deutschland) wurden mit DMEM-high Glucose auf 1 ml aufgefüllt. Insulin-Transferrin-Selenite-Lösung (ITS)+1 Premix (Sigma-Aldrich) und 10 ng/ml transforming-growth-factor-beta (TGF- $\beta$ , R&D Systems) wurden dem chondrogenen Medium vor dem Mediumwechsel frisch zugemischt. Alle drei Tage wurde das verbrauchte chondrogene Medium durch frisches Medium ersetzt. Bei 37°C und 5%  $\text{CO}_2$  wurden die chondrogenen Pellets im Brutschrank gelagert. Nach etwa drei bis vier Wochen hatten sich aus dem Zellmaterial stabile und widerstandsfähige Knorpelkugeln geformt.

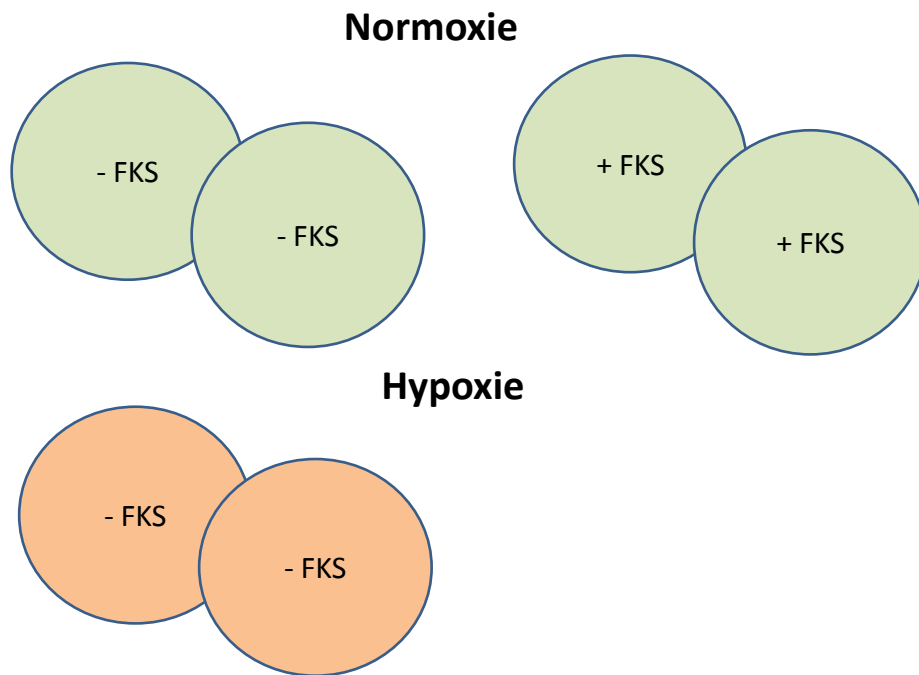


**Abbildung 15:** Zelllinie ZK 20 chondrogen differenziert, vier Wochen nach Zentrifugation und Inkubation im chondrogenen Medium (weißer Pfeil) hat sich ein Knorpelkugelchen formiert (schwarzer Pfeil), Maßstab: 2,5 mm.

#### 2.1.4 Zellkultivierung unter Hypoxie

Um die multipotenten Stromazellen einer Hypoxie auszusetzen, wurden sie in sechs getrennte Petrischalen vom Typ „Easy Grip™“ (35 x 10 Millimeter, FALCON, Plymouth, England) ausgesät. Jeder Petrischale wurde zusätzlich 3 ml Iscove's Modified Dulbecco's Medium (IMDM, Invitrogen) zugeführt, welches mit 1,2% Penicillin-Streptomycin (Invitrogen) versehen war. Zwei der Proben, die unter normoxischen Bedingungen bebrütet werden sollten, wurde zusätzlich FKS Gold (PAA) beigelegt. Nun wurden zwei der Proben (ohne FKS) einem sauerstoffarmen Milieu ausgesetzt. Dazu wurde eine Hypoxiekammer (Genbox anaer, bioMérieux, Nürtingen, Deutschland) verwendet. Das Prinzip dieser Genbox ist, Sauerstoff zu absorbieren und Kohlenstoffdioxid freizugeben. Dies wird mit Hilfe eines Generators ermöglicht, welcher Aktivkohle, Natriumascorbat sowie weitere organische und anorganische Bestandteile enthält. Bereits nach 2,5 Stunden beträgt der Sauerstoffgehalt in der Kammer nur noch weniger als 0,1% und der Anteil des Kohlenstoffdioxids mehr als 15%. Im Folgenden wurden die Zellproben über einen Zeitraum von acht Stunden, bei einer Temperatur von 37°C inkubiert.

Die Inkubation der restlichen vier Petrischalen (zwei mit FKS und zwei ohne FKS) erfolgte bei 37°C, 5% CO<sub>2</sub> und einer Luftfeuchtigkeit von 95%.



**Abbildung 16:** Den Petrischalen unter Hypoxie wurde kein FKS ( - FKS) zugesetzt. Die normoxischen Proben wurden zur Hälfte mit FKS ( + FKS) genährt, zur Hälfte nicht.



## **2.2 Reverse-Transkriptase Polymerase-Ketten-Reaktion (RT-PCR)**

### **2.2.1 RNA-Isolierung**

Mit Hilfe des RNeasy-mini-Kit (QIAGEN, Hilden, Deutschland) wurde die gesamte RNA nach Angaben des Herstellers aus den Zelllinien isoliert. Im Vorfeld wurden die Zellen dreimal in PBS (Invitrogen) gewaschen und in 600 µl Lysis-Puffer (RLT-Puffer mit 1% β-Mercapthoethanol, QIAGEN) lysiert. Danach erfolgte eine Homogenisierung durch die QIAshredder-spin-Säule (QIAGEN), mittels Zentrifugation bei 18000 rpm für zwei Minuten (25°C). Zum Durchfluss wurden anschließend 600 µl 70% Ethanol (Riedel-de-Haen) zugegeben. Mittels Zentrifugation für 15 Sekunden bei 25°C und 10000 rpm wurde die RNA an die RNeasy-mini-Kit-Säule gebunden. Anschließend wurde die RNA folgendermaßen gereinigt. Im ersten Schritt wurden der RNA 700 µl Puffer RW1 (QIAGEN) zugesetzt. Darauf folgten zwei Waschgänge mit je 500 µl Puffer RPE (zuvor mit vierfachem Volumen Ethanol versetzt) (QIAGEN). Nach Trocknen der Säule für zwei Minuten bei 10000 rpm und 25°C erfolgte eine Eluierung der RNA durch Zugabe von 50 µl RNase-freiem Wasser (Braun, Melsungen, Deutschland). Die Bestimmung des RNA-Gehaltes erfolgte photometrisch bei einer Wellenlänge von 260 nm (siehe 2.3.2). Die RNA wurde bei -80°C eingefroren.

Die RNA-Extraktion der chondrogenen Pellets wurde mit Trizol durchgeführt. Hierzu wurden die Pellets mediumfrei in ein mit 800 µl Trizol und 10 µl Glycogen (20 mg/ml) gefülltes Schraubdeckeltube überführt und homogenisiert. Nach einer Inkubation von fünf Minuten bei Raumtemperatur erfolgte eine Phasentrennung. Durch Zugabe von 200 µl Chloroform pro eingesetztem ml Trizol und 15-minütigem Zentrifugieren bei 4°C und 12000 g wurde die RNA ausgefällt. Der oberen, wässrigen Phase wurden nun 0,5 ml Isopropanol zugesetzt (pro ml eingesetztem Trizol) und nach zehn Minuten Zentrifugation bei 12000 g und 4°C erfolgte das Waschen der RNA mit 75% Ethanol in DEPC-Wasser. Bei 4°C wurde die RNA nochmals fünf Minuten bei 7500 g zentrifugiert und das entstandene Pellet wurde zum Trocknen in den Brutschrank (37°C) gelegt. Im Anschluss wurde die RNA in 20 µl DEPC-Wasser gelöst. Der RNA-Gehalt des gelösten Pellets wurde photometrisch

bei einer Wellenlänge von 260 nm bestimmt (siehe 2.3.2). Die Lagerung der Pelletlösung erfolgte bei -80°C.

### 2.2.2 cDNA-Synthese

Zur cDNA-Synthese wurden 1 µg RNA eingesetzt. Um Kontaminationen aus genomischer DNA abzubauen, wurden der RNA 1 µl DNase I (1 U/µl, Invitrogen) und 1 µl 10x DNase-Puffer (Invitrogen) zugesetzt und bei 25°C für 15 Minuten inkubiert. Durch Zugabe von 1 µl Ethylendiamin-tetraacetat (EDTA, 25 mM, Invitrogen) wurde der DNA-Verdau durch Inkubation bei 65°C für zehn Minuten gestoppt. Nach Hinzupipettieren von 1 µl Oligo (dt)18 (0,5 µg/ml, MWG Biotech, Ebersberg), 1 µl dNTP-Mix (je 10 mM dATP, dGTP, dCTP, dTTP bei pH 7,0, Perkin Elmer, Wellesley, USA), 4 µl 5x First Strand Puffer (Invitrogen) und 2 µl 0,1 M Dithiothreitol (DTT, Invitrogen) wurde die RNA mit Hilfe von 1 µl Superscript II H-Reverse Transcriptase (200 U/µl, Invitrogen) für 50 Minuten bei 42°C in cDNA umgeschrieben. Zur Kontrolle des vollständigen Abbaus der genomischen DNA, wurde einem Ansatz statt der Reversen Polymerase 1 µg RNase-freies Wasser zugesetzt und als RT-Negativkontrolle bei den RT-PCRs mitgeführt (Negativ-RT). Durch 15-minütiges Erhitzen auf 70°C wurde die cDNA-Synthese gestoppt. Die cDNA wurde zur Lagerung bei -20°C eingefroren.

### 2.2.3 Durchführung der RT-PCR

Zunächst wurde ein Mastermix aus 2 µl MgCl<sub>2</sub>-Puffer (25 mM, Applied Biosystems, Weiterstadt, Deutschland), 2,5 µl 10x PCR-Puffer II (Applied Biosystems), 0,625 µl dNTP-Mix, 0,125 µl Taq DNA-Polymerase (AmpliTaq Gold 5 U/µl, Applied Biosystems) und 17,5 µl RNase-freiem Wasser hergestellt. Außerdem wurden dem Mastermix 1 µl cDNA und je 0,625 µl forward und reverse Primer (200 pmol/µl, MWG Biotech) zugegeben. Als Negativkontrolle wurde in jeweils einer Probe die cDNA durch RNase-freies Wasser ersetzt. Zur Amplifikation der DNA-Abschnitte erfolgte als Erstes eine Denaturierung des DNA-Doppelstranges bei 95°C für zwölf Minuten im Thermocycler (BIO-RAD Laboratories, München, Deutschland).

Danach wurden 40 Zyklen folgenden Ablaufs durchgeführt: Bei 95°C erfolgte für 45 Sekunden die Denaturierung der neuentstandenen DNA-Doppelstränge. Die Primer hybridisierten mit den komplementären DNA-Abschnitten für 45 Sekunden bei einer Annealing-Temperatur zwischen 55°C und 64°C (siehe Tabelle 1). Die Taq-DNA-Polymerase initiierte bei 72°C für 45 Sekunden zwischen den beiden Primern die Polymerisierung des neuen DNA-Abschnitts. Im letzten Schritt wurde die DNA bei 72°C für sieben Minuten zu Ende repliziert und anschließend auf 4°C heruntergekühlt.

Für die humanen Primer Osteopontin (OPN) und Aggrecan (Agg) wurde folgendes Protokoll durchgeführt: Für OPN wurde ein Mastermix aus 14,4 µl RNase-freiem Wasser, 2,5 µl Taq-Mg-Puffer (Eppendorf, Hamburg, Deutschland), 0,5 µl dNTP 10 mM, 5 µl Enhancer (Eppendorf), jeweils 0,7 µl forward und reverse Primer und 0,2 µl Taq-DNA-Polymerase (5Prime, Hamburg, Deutschland) hergestellt. Dem Mastermix wurde 1 µl cDNA bzw. 1 µl Negativ-RT hinzugefügt. Der PCR-Ansatz für Agg beinhaltete 18,4 µl RNase-freies Wasser, 2,5 µl Puffer advanced (5Prime), 0,5 µl dNTP 10 mM, jeweils 0,7 µl forward und reverse Primer sowie 0,2 µl der Taq-DNA-Polymerase (5Prime). Dem entstandenen Mix wurden 2 µl cDNA bzw. 2 µg Negativ-RT hinzugefügt.

Zur Amplifikation der OPN- und Agg-DNA-Abschnitte erfolgte als Erstes eine Denaturierung des DNA-Doppelstranges bei 95°C für zwei Minuten im Thermocycler. Danach wurden 38 Zyklen folgenden Ablaufs durchgeführt: Bei 95°C erfolgte für 20 Sekunden die Denaturierung der neuentstandenen DNA-Doppelstränge. Die Primer hybridisierten mit den komplementären DNA-Abschnitten für 20 Sekunden bei einer Annealing-Temperatur zwischen 52°C und 58°C (siehe Tabelle 2). Die Taq-DNA-Polymerase initiierte bei 65°C für 20 Sekunden zwischen den beiden Primern die Polymerisierung des neuen DNA-Abschnitts. Im letzten Schritt wurde die DNA bei 65°C für sieben Minuten zu Ende repliziert und anschließend auf 4°C heruntergekühlt.

Als Primer wurden RNA-Oligonukleotide einer Basenpaarlänge von etwa 20 Basenpaaren (bp) verwendet. Die Primer binden komplementär an die spezifische Stelle der DNA (siehe Tabelle 2).

<b>Primer</b>	<b>Sequenz (5'-3')</b>	<b>Produkt- länge</b>	<b>Annealing- temperatur</b>	<b>Genbank- Zugangs- nummer</b>
<b>IMD</b>  for rev	GTTGCATCAGCCTCCTCTG AGCTTCCAGACCACAGGTC	156 bp (294-450)	64°C	NM_024866
<b>AM</b>  for rev	ATGAAGGGTGCCTCTCGAAG GATCTGGTGTGCCAGCTTCT	155 bp (260-415)	60°C	XM_508280
<b>CRLR<sub>1</sub></b>  for rev	ATGGATGGCTCTGCTGGA CTGTTGCTTGCTGGATGTC	147 bp (757-904)	62°C	NM_005795
<b>CRLR<sub>2</sub></b>  for rev	CATCTCCTCTACATTATCCAT ATTGCTTGAACCTCTCCATTA	316 bp (1413-1729)	55°C	NM_005795
<b>BMG</b>  for rev	TCTCTCTTTCTGGCCTGGAG CAACTTCAATGTCGGATGGA	134 bp (98-232)	60°C	NM_004048
<b>RAMP1</b>  for rev	CTCACCCAGTTCCAGGTAGA GAACCTGTCCACCTCTGCAT	155 bp (253-408)	62°C	NM_005855
<b>RAMP2</b>  for rev	GGGACGGTGAAGAACTATGA AAGCCCAGGTCAAACAACTC	166 bp (234-400)	62°C	NM_005854
<b>RAMP3</b>  for rev	AACTTCTCCCGTTGCTGCT ACACGATGAACTCGGACAG	164 bp (90-254)	62°C	NM_005856
<b>OPN</b>  for rev	CCGAGGTGATAGTGTGGTTTA CTGCTTGTGGCTGTGGGTTTC	252 bp (639-891)	59°C	NM_001040058
<b>Agg</b>  for rev	GCCACCTTTCAGTGTCCATT CTGCAGTGATGACCCTCAGA	299 bp (124-423)	52,2°C	NM_013227
<b>PPAR<sub>γ</sub></b>  for rev	GTTTCATGCTTGTGAAGGATGC ACTCTGGATTCAGCTGGTCG	249 bp (548-797)	60°C	NM_015869

Primer	Sequenz (5'-3')	Produktlänge	Annealingtemperatur	Genbank-Zugangsnummer
<b>CD90</b>  for rev	AGCATCGCTCTCCTGCTAAC GCACGTGCTTCTTTGTCTCA	172 bp (464-635)	58°C	NM_006288

**Tabelle 2:** Primersequenzen der verwendeten Primer mit den dazugehörigen Produktlängen, den Temperaturen und entsprechenden Nummern der Gendatenbank <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>

#### 2.2.4 Auswertung der RT-PCR-Produkte

Die Auswertung bezüglich Größe und Reinheit der PCR-Produkte erfolgte mit Hilfe der Gelelektrophorese. Aus 0,6 g Agarose (Inno-Train Diagnostik, Kronberg/Taunus, Deutschland) und 30 ml TAE-Puffer (1x, für 50x: 242 g Tris Base (Merck, Darmstadt, Deutschland) 57,1 ml Essigsäure und 100 ml EDTA (0,5 M, pH 8,0, Carl Roth)) wurde ein 2%iges Agarosegel hergestellt. Die Auftrennung der DNA-Fragmente nach ihrer Größe erfolgte nach Anlegen einer elektrischen Spannung zwischen 110 V und 115 V. Den PCR-Proben wurde vorher ein DNA-Loading-Puffer hinzupipettiert (5Prime) (in 50% Glycerol-Wasser-Gemisch mit je 50 mM Tris-HCL und EDTA, pH 8,0). Unter UV-Licht konnten die DNA-Banden mittels Markierung (SYBRgreen, Sigma-Aldrich) sichtbar gemacht werden. Zum Vergleich der Höhe der einzelnen Banden diente ein standardisierter Basenpaar-Marker (50 bp- bzw. 100 bp-DNA-Ladder, Gibco BRL, Karlsruhe, Deutschland).

## 2.3 real-time RT-PCR

### 2.3.1 RNA-Isolierung

Die Extraktion der RNA der multipotenten Stromazellen fand gemäß dem Schema im Abschnitt 2.2.1 statt und erfolgte gleichermaßen mit dem RNeasy Mini Kit (QIAGEN) nach Angaben des Herstellers.

### 2.3.2 Messung der Konzentration und Reinheit der RNA

Mit Hilfe eines UV-Spektrometers (Biochrom, Cambridge, England) erfolgte die Messung der Konzentration und Reinheit der zuvor gewonnenen RNA. Hierfür wurden Einmal-Plastikküvetten (Brand GmbH, Wertheim, Deutschland) eingesetzt. Nachdem das Spektrometer mit 99 µl TE-Puffer (pH 7,5) geeicht wurde, konnte 1 µl der RNA-Lösung zugegeben werden. Nun erfolgte bei einer Wellenlänge von 260 nm die Messung der Absorption. Nach folgender Formel wurde die RNA-Konzentration automatisch durch das Spektrometer ermittelt:

$$RNA\text{-Konzentration} = 44 \mu\text{g/ml} \times A_{260} \times \text{Verdünnungsfaktor}$$

Demzufolge entspricht ein Absorptionswert von 1 einer Konzentration von 44 µg/ml, bei einer Wellenlänge von 260 nm. Beträgt das Verhältnis von RNA-Lösung zu TE-Puffer 1 µl zu 99 µl, ergibt sich daraus ein Verdünnungsfaktor von 100. Die Verunreinigungen von RNA-Proben weisen meist ein Absorptionsmaximum von 280 nm auf. So wurden die ermittelten Absorptionswerte bei 260 nm und 280 nm ins Verhältnis zueinander gesetzt. Diese Schlussfolgerung lässt nun eine Aussage über die Reinheit der RNA-Proben zu.

### **2.3.3 cDNA-Synthese**

Mit Hilfe des QuantiTect® Reverse Transcription Kits (QIAGEN) erfolgte die cDNA-Synthese der isolierten RNA nach Angaben des Herstellers. Nach erfolgter Isolierung der RNA wurde diese mit 2 µl DNA Wipeout Buffer versetzt und mittels RNase-freiem Wasser zu einem Gesamtvolumen von 14 µl aufgefüllt. Diese Lösung wurde bei 42°C für zwei Minuten inkubiert. Dies dient der Beseitigung von restlicher genomischer DNA, die während des RNA-Isolationsprozesses nicht vollständig entfernt wurde. Im Anschluss wurden dem Gemisch 4 µl Quantiscript RT Buffer, 1 µl Quantiscript Reverse Transcriptase und 1 µl RT Primer Mix, bestehend aus einer Mischung aus Oligo(dT)- und Random-Primern, beigelegt. Nun erfolgte eine Inkubation von 30 Minuten bei 42°C und weiteren drei Minuten bei 95°C, um die Reverse Transcriptase vollständig zu inaktivieren. Um eine sichere Elimination restlicher genomischer DNA zu gewährleisten, wurde aus jeder RNA-Probe ein Negativansatz hergestellt. Hierzu wurde die Quantiscript Reverse Transcriptase durch 1 µl RNase-freies Wasser ersetzt.

### **2.3.4 RT-PCR**

Die RT-PCR dient an dieser Stelle vorrangig der Überprüfung der vorangegangenen Schritte (cDNA-Synthese) und soll die Bedingungen für die folgende real-time PCR festlegen. Die beschriebenen Reaktionsschritte erfolgten alle im iCycler PCR-Gerät (Bio-Rad).

Zunächst erfolgte der Nachweis von AM und IMD an der cDNA einer Zellreihe der multipotenten Stromazellen (insgesamt n=5).

### **2.3.5 Auswertung der RT-PCR**

Die Auswertung bezüglich Größe und Reinheit der PCR-Produkte erfolgte wiederum mit Hilfe der Gelelektrophorese. Aus 0,6 g Agarose (Inno-Train Diagnostik) und 30 ml TAE-Puffer (1x, für 50x: 242 g Tris Base (Merck) 57,1 ml Essigsäure und 100 ml EDTA (0,5 M, pH 8,0, Carl Roth)) wurde ein 2%iges Agarosegel hergestellt. Die

Auftrennung der DNA-Fragmente nach ihrer Größe erfolgte nach Anlegen einer elektrischen Spannung zwischen 110 V und 115 V. Den PCR-Proben wurde vorher ein DNA-Loading-Puffer hinzupipettiert (5Prime) (in 50% Glycerol-Wasser-Gemisch mit je 50 mM Tris-HCL und EDTA, pH 8,0). Unter UV-Licht konnten die DNA-Banden mittels Markierung (SYBRgreen, Sigma-Aldrich) sichtbar gemacht werden. Zum Vergleich der Höhe der einzelnen Banden diente ein standardisierter Basenpaar-Marker (50 bp- bzw. 100 bp-DNA-Ladder, Gibco BRL).

### **2.3.6 Etablierung der Primer und Bedingungen der real-time PCR**

Die im Folgenden erwähnten Reaktionsschritte zur Durchführung der real-time PCR erfolgten in einem iCycler PCR-Gerät inklusive MyiQ Single-Color real-time PCR Detection System (Bio-Rad) sowie einer iQ<sup>TM</sup>5 Optical System Software Version 2.0 (Bio-Rad).

Zur Etablierung der optimalsten Bedingungen für die real-time PCR, wurden cDNA-Verdünnungsreihen der Bohrmehlzelllinien angefertigt.

Bei den Zielgenen handelte es sich um beta-Mikroglobulin ( $\beta$ MG) als housekeeping-Gen und um AM sowie IMD aus der Calcitoninrezeptor-Like-Rezeptor-Familie.

Zunächst wurden die zu untersuchenden Proben mit aqua ad injectabilia im Verhältnis von 1:10 verdünnt. Die nun vorliegende Probe wurde wiederum im Verhältnis 1:10 verdünnt, so dass die Zielgene jeweils an unverdünnten und 1:10 sowie 1:100 verdünnten cDNA-Proben untersucht werden konnten. In der Negativkontrolle wurde die cDNA durch Reinstwasser ersetzt. Mit Hilfe des QuantiFast SYBR Green Mastermix-Systems (QIAGEN) konnten nun die Primer und Bedingungen etabliert werden, indem 1  $\mu$ l der verdünnten oder unverdünnten cDNA-Probe mit 24  $\mu$ l des Mastermixes versetzt wurde. Der Mastermix besteht aus 12,5  $\mu$ l QuantiFast SYBR Green Mastermix, 0,5  $\mu$ l forward und reverse Primer (je 20  $\mu$ M) und 11,5  $\mu$ l aqua ad injectabilia. Anschließend erfolgte die Denaturierung des DNA-Doppelstranges bei 95°C für fünf Minuten. Nun folgte ein Zyklus von 40 Schritten, in denen die Proben jeweils für zehn Sekunden auf 95°C erhitzt und anschließend wieder für 30 Sekunden auf 60°C heruntergekühlt wurden. Dieser Vorgang dient der Primerbindung und Elongation.



Nun muss die Analyse einer Schmelzkurve erfolgen. Darunter wird diejenige Temperatur verstanden, bei der es wieder zur Lösung des Farbstoffes aus der DNA kommt. Dieser Farbstoff, namens SYBR Green, war Bestandteil im Mastermix und hat sich während der abgelaufenen Zyklen an den DNA-Doppelstrang geheftet und begann zu fluoreszieren. Je nach Länge des PCR-Produktes können nun unterschiedliche Fluoreszenzwerte nach der Elongation ermittelt werden.

Die beschriebene Analyse der Schmelzkurve erfolgte nach folgenden Schritten: Für eine Minute wird die DNA wiederum bei 95°C denaturiert und anschließend auf 65°C runtergekühlt (1 Minute). Es folgen 61 Zyklen, in denen die Probe stufenweise von 65°C auf 95°C erhitzt wird. Nach jeweils zehn Sekunden erfolgt ein Temperaturanstieg um 0,5°C. Nach jedem Zyklus wurden dabei die Fluoreszenzwerte ermittelt und aus diesen die Effizienz der PCR sowie der Korrelationskoeffizient für die Zielgene erfasst.

### 2.3.7 Durchführung der real-time PCR

Nachdem nun die Etablierung der Bedingungen und der Primer erfolgt ist, kann die real-time PCR durchgeführt werden. Zusätzlich zu den Zielgenen wurden die entsprechenden Negativkontrollen mitgeführt.

Wiederum wurde zur Untersuchung der mRNA von AM und IMD das QuantiFast SYBR Green Mastermix-System (QIAGEN) verwendet. Es kam 1 µl unverdünnte cDNA zum Einsatz und als housekeeping-Gen wurde βMG verwendet (siehe Tabelle 3).

Primer	Sequenz (5'-3')	Produktlänge	Annealingtemperatur	Genbank-Zugangsnummer
<b>IMD</b>  for rev	GTTGCATCAGCCTCCTCTG AGCTTCCAGACCACAGGTC	156 bp (294-450)	64°C	NM_024866
<b>AM</b>  for rev	ATGAAGGGTGCCTCTCGAAG GATCTGGTGTGCCAGCTTCT	155 bp (260-415)	60°C	XM_508280

Primer	Sequenz (5'-3')	Produktlänge	Annealingtemperatur	Genbank-Zugangsnummer
BMG  for rev	TCTCTCTTTCTGGCCTGGAG CAACTTCAATGTCGGATGGA	134 bp (98-232)	60°C	NM_004048

**Tabelle 3:** Primersequenzen der verwendeten Primer mit den dazugehörigen Produktlängen, der Temperaturen und entsprechenden Nummern der Gendatenbank <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>

### 2.3.8 Auswertung der real-time PCR

Um die ermittelten Werte der real-time PCR zu veranschaulichen, wurde eine logarithmische Darstellung bestehend aus einer x- und einer y-Achse gewählt. Auf der Ordinatenachse kommen die Fluoreszenzwerte zum Ausdruck, auf der Abszissenachse die Anzahl der Zyklen. Anschließend wird ein sogenanntes Threshold-Level ermittelt. Dies ist die Bezeichnung für den Wert der y-Achse, der die PCR-Verlaufskurven der jeweiligen cDNA-Probe ungefähr in ihrem Wendepunkt schneidet. Jeder dieser Schnittpunkte besitzt wiederum einen entsprechenden Wert auf der Abszissenachse, der nun als Cycle-Threshold (CT-Wert) bezeichnet wird.

Nun erfolgten die Analyse der Schmelzkurven sowie CT-Werte der einzelnen cDNA-Proben und die Berechnung ihrer Mittelwerte.

Um nun die Expression der mRNA von AM und IMD vergleichen zu können, muss eine Quantifizierung der PCR stattfinden. Hierzu half die  $(\Delta\Delta CT)$ -Methode nach Pfaffl. Dazu werden die CT-Werte von AM und IMD gegen die des housekeeping-Gens normalisiert:  $CT\text{-Wert AM} - CT\text{-Wert } \beta\text{-MG}$  bzw.  $CT\text{-Wert IMD} - CT\text{-Wert } \beta\text{-MG}$ . Aus dieser Subtraktion ergibt sich der sogenannte delta CT-Wert ( $dCT$ ) (Pfaffl 2001). Die Auswertung der  $dCT$ -Werte erfolgte mit der SPSS Statistik- und Analyse-Software (SPSS Inc., Chicago, USA).

Zum Vergleich der ermittelten  $dCT$ -Werte wurde zunächst der Kruskal-Wallis-Test angewendet. Ein Verfahren, das einen nichtparametrischen statistischen Rangsummentest darstellt und dem Vergleich mehrerer unabhängiger Stichproben oder Gruppen im Hinblick auf eine Variable dient (Kruskal and Wallis 1952). Dieser

Test wird zusätzlich als H-Test bezeichnet. Zeigten sich durch diesen Test, bei der Untersuchung der Werte, signifikante Unterschiede, so wurde mit dem U-Test oder auch Mann-Whitney-Test fortgefahren (*Mann and Whitney 1947*). Auch er stellt einen nichtparametrischen statistischen Rangsummentest für unabhängige Stichproben dar, der die Signifikanz der Übereinstimmung zweier Verteilungen ermitteln soll.

Zur grafischen Darstellung der Ergebnisse kommt nun die Abbildung durch Boxplots zum Zuge. Diese Box verdeutlicht den Bereich, in den die mittleren 50% der Werte fallen. Des Weiteren ist die Box durch verschiedene Markierungen gekennzeichnet. Den Median, das untere und das obere Quartil und die beiden Extremwerte. Der Median teilt das Diagramm in zwei Hälften mit jeweils 50%iger Verteilung der Werte. Das untere Quartil: 25% der Daten sind kleiner oder gleich diesem Wert. Das obere Quartil: 75% sind kleiner oder gleich dieser Markierung. Die beiden Extremwerte, oder auch Whiskers bezeichnet, kennzeichnen jeweils den kleinsten und größten Wert.

Zeigen sich auch im U-Test signifikante Unterschiede, so werden die verglichenen Werte als signifikant bezeichnet, bei einer Irrtumswahrscheinlichkeit  $p < 0,05$ . Liegt die Irrtumswahrscheinlichkeit  $p < 0,01$  so besitzen die Werte eine hohe Signifikanz.

### **3 Ergebnisse**

#### **3.1 Expression von Adrenomedullin und Intermedin in der Osteosarkomzelllinie TE 85**

##### **3.1.1 Adrenomedullin**

In der humanen Osteosarkomzelllinie TE 85 ( $n = 5$ ) wurde AM-mRNA als einzelne, saubere Bande mit der erwarteten Größe von 155 bp nachgewiesen (siehe Abbildung 17). In der Negativkontrolle, bei der die cDNA durch Reinstwasser ersetzt wurde, konnte keine mRNA nachgewiesen werden. Als Biomarker für den Nachweis von RNA diente  $\beta$ MG. Auch hierbei erfolgte ein mRNA-Nachweis. Primer für OPN dienten als Positivkontrolle zum Nachweis von osteogenem Zellmaterial. Eine Expression konnte beobachtet werden.

##### **3.1.2 Intermedin**

Die IMD-mRNA wurde als einzelne, saubere Bande mit der erwarteten Größe von 156 bp in der humanen Osteosarkomzelllinie TE 85 ( $n = 5$ ) nachgewiesen (siehe Abbildung 17). Reinstwasser ersetzte die cDNA in der Negativkontrolle. Hierbei wurde keine mRNA nachgewiesen. Als Biomarker für das Vorhandensein von RNA wurde  $\beta$ MG verwendet. Als Positivkontrolle für den Nachweis von osteogenem Zellmaterial dienten Primer für OPN. Dabei gelang abermals der Nachweis.

## **3.2 Expression von Adrenomedullin und Intermedin in multipotenten Stromazellen**

### **3.2.1 Adrenomedullin**

#### **undifferenzierte multipotente Stromazellen**

In undifferenzierten multipotenten Stromazellen des Bohrmehls ( $n = 5$ ) wurde AM-mRNA als einzelne, saubere Bande mit der erwarteten Größe von 155 bp nachgewiesen (siehe Abbildung 18). In der Negativkontrolle wurde die cDNA durch Reinstwasser ersetzt. Hierbei konnte kein Nachweis für die mRNA erfolgen. Als Biomarker für die Existenz von RNA diente das  $\beta$ MG. Dabei zeigte sich ein positives Ergebnis. Primer für CD90 dienten als Positivkontrolle und wurden in allen undifferenzierten Zelllinien nachgewiesen.

#### **adipogen differenzierte Stromazellen**

Mit einer erwarteten Größe von 155 bp wurde AM-mRNA als einzelne, saubere Bande in adipogenem Zellmaterial ( $n = 5$ ) nachgewiesen (siehe Abbildung 19). Reinstwasser ersetzte die cDNA in der Negativkontrolle, in der kein Nachweis der mRNA zu verzeichnen war.  $\beta$ MG wurde als Biomarker für den Nachweis von RNA eingesetzt. Dabei konnte mRNA nachgewiesen werden. Primer für Peroxisome proliferator-activated receptor gamma (PPAR $\gamma$ ) dienten als Positivkontrolle dem Beweis der adipogenen Differenzierung. Auch hier gelang ein positives Ergebnis.

#### **chondrogen differenzierte Stromazellen**

In vier von fünf Proben des chondrogenen Bohrmehlmaterials ( $n = 5$ ) wurde AM-mRNA als einzelne, saubere Bande mit der erwarteten Größe von 155 bp nachgewiesen (siehe Abbildung 20). Als Negativkontrolle wurde die cDNA durch Reinstwasser ersetzt. Ein positives Ergebnis wurde bei Verwendung des  $\beta$ MG Primerpaars gezeigt, das dem Nachweis von RNA diente. Zum Nachweis für die

chondrogene Differenzierung wurde Agg als Positivkontrolle eingesetzt und eine Expression gezeigt.

### **osteogen differenzierte Stromazellen**

In osteogen differenzierten Zellen des Bohrmehlmaterials ( $n = 5$ ) konnte in vier von fünf Proben AM-mRNA als einzelne, saubere Bande mit der erwarteten Größe von 155 bp nachgewiesen werden (siehe Abbildung 21). Als Negativkontrolle wurde die cDNA durch Reinstwasser ersetzt. Hierbei zeigte sich ein negatives Ergebnis. Als Biomarker für das Vorhandensein von RNA wurde  $\beta$ MG verwendet. Primer für OPN dienten als Positivkontrolle für den Nachweis der osteogenen Differenzierung. Für beide Primer, OPN und  $\beta$ MG, konnte der Nachweis erbracht werden.

## **3.2.2 Intermedin**

### **undifferenzierte multipotente Stromazellen**

IMD-mRNA wurde als einzelne, saubere Bande mit einer erwarteten Größe von 156 bp in multipotenten Stromazellen ( $n = 5$ ) nachgewiesen (siehe Abbildung 18). In der Negativkontrolle, bei der die cDNA durch Reinstwasser ersetzt wurde, konnte keine mRNA nachgewiesen werden.  $\beta$ MG diente zur Kontrolle und Effizienz der RNA-Isolierung und cDNA-Synthese. Es zeigte sich ein positives Ergebnis. CD90 wurde als Positivkontrolle verwendet und in den undifferenzierten Zelllinien nachgewiesen.

### **adipogen differenzierte Stromazellen**

In vier von fünf Proben des adipogen differenzierten Bohrmehls ( $n = 5$ ) wurde IMD-mRNA als einzelne, saubere Bande mit der erwarteten Größe von 156 bp nachgewiesen (siehe Abbildung 19). Reinstwasser ersetzte in der Negativkontrolle die cDNA. Dabei gelang der Nachweis nicht. Als Biomarker für den Nachweis von RNA diente das  $\beta$ MG. PPAR $\gamma$  wurde als Positivkontrolle für die adipogene Differenzierung verwendet.  $\beta$ MG als auch PPAR $\gamma$  wurden hierbei nachgewiesen.

### **chondrogen differenzierte Stromazellen**

Mit einer erwarteten Größe von 156 bp wurde IMD-mRNA als einzelne, saubere Bande in chondrogenem Bohrmehlmaterial (n = 5) in vier von fünf Proben nachgewiesen (siehe Abbildung 20). In der Negativkontrolle wurde die cDNA durch Reinstwasser ersetzt und ein Nachweis konnte nicht erfolgen. Das Vorhandensein von RNA wurde mittels  $\beta$ MG überprüft und gezeigt. Primer für Agg dienten als Positivkontrolle dem Nachweis einer chondrogenen Differenzierung. Hierbei war ein positives Ergebnis zu beobachten.

### **osteogen differenzierte Stromazellen**

In osteogen differenzierten Zellen des Bohrmehls (n = 5) wurde IMD-mRNA als einzelne, saubere Bande mit der erwarteten Größe von 156 bp nachgewiesen (siehe Abbildung 21). In der Negativkontrolle wurde die cDNA durch Reinstwasser ersetzt. Ein negatives Ergebnis war zu beobachten. Als Biomarker für den Nachweis von RNA diente das  $\beta$ MG. OPN wurde als Positivkontrolle zum Nachweis für die osteogene Differenzierung eingesetzt. Ein positives Ergebnis ließ sich bei beiden Markern verzeichnen.

### **3.3 Expression von CRLR und RAMP 1-3 in der Osteosarkomzelllinie TE 85**

#### **3.3.1 CRLR**

In der humanen Osteosarkomzelllinie TE 85 wurde CRLR-mRNA bei einer Basenpaarlänge von 316 bp nachgewiesen (siehe Abbildung 17). Als Biomarker für das Vorhandensein von RNA diente  $\beta$ MG. Hierbei konnte ebenfalls ein Nachweis erfolgen. Primer für OPN dienten als Positivkontrolle dem Nachweis von osteogenem Zellmaterial. Auch hier wurde ein positives Ergebnis beobachtet.

#### **3.3.2 RAMP 1**

In vier von fünf Proben der humanen Osteosarkomzelllinie TE 85 ( $n = 5$ ) wurde RAMP 1-mRNA als einzelne, saubere Bande mit einer erwarteten Größe von 156 bp nachgewiesen (siehe Abbildung 17). Reinstwasser ersetzte die cDNA in der Negativkontrolle, in der kein Nachweis von mRNA gelang.  $\beta$ MG diente zur Kontrolle der Effizienz der RNA-Isolierung und cDNA-Synthese. Zum Nachweis von osteogenem Zellmaterial kamen als Positivkontrolle Primer für OPN zum Einsatz. Bei  $\beta$ MG und OPN konnte ein positives Ergebnis beobachtet werden.

#### **3.3.3 RAMP 2**

RAMP 2-mRNA wurde als einzelne, saubere Bande mit der erwarteten Größe von 167 bp in vier von fünf Proben der humanen Osteosarkomzelllinie TE 85 ( $n = 5$ ) nachgewiesen (siehe Abbildung 17). Die cDNA wurde in der Negativkontrolle durch Reinstwasser ersetzt und somit wurde dabei keine mRNA nachgewiesen. Das Vorhandensein von RNA wurde mittels  $\beta$ MG überprüft und gezeigt. Primer für OPN dienten als Positivkontrolle dem Nachweis von osteogenem Zellmaterial. Bei dieser Untersuchung war das Ergebnis ebenfalls positiv.



### **3.3.4 RAMP 3**

In der humanen Osteosarkomzelllinie TE 85 (n = 5) konnte keine RAMP 3-mRNA nachgewiesen werden (siehe Abbildung 17). Als Positivkontrolle wurde im humanen Dottersack eine einzelne, saubere Bande mit einer erwarteten Größe von 165 bp nachgewiesen (siehe Abbildung 17). Als Biomarker für den Nachweis von RNA kam  $\beta$ MG zum Einsatz. Als Positivkontrolle wurden Primer für OPN zum Nachweis von osteogenem Zellmaterial verwendet. Sowohl das Vorhandensein von Zellmaterial allgemein als auch von osteogen differenzierten Zellen konnte mit dieser Methode bewiesen werden.

### **3.4 Expression von CRLR und RAMP 1-3 in multipotenten Stromazellen**

#### **3.4.1 CRLR**

##### **undifferenzierte multipotente Stromazellen**

In undifferenzierten Bohrmehlzellen (n = 5) konnte in vier von fünf Proben CRLR-mRNA als einzelne, saubere Bande mit einer erwarteten Größe von 147 bp nachgewiesen werden (siehe Abbildung 18). Die cDNA wurde in der Negativkontrolle durch Reinstwasser ausgetauscht und ein Nachweis von mRNA war nicht möglich. Als Biomarker für den Nachweis von RNA diente das  $\beta$ MG. Hierbei gelang ein positives Ergebnis. Primer für CD90 kamen als Positivkontrolle zum Einsatz und konnten in den undifferenzierten Zelllinien nachgewiesen werden.

##### **adipogen differenzierte Stromazellen**

Mit einer Größe von 147 bp wurde CRLR-mRNA als einzelne, saubere Bande in vier von fünf Proben des adipogen differenzierten Bohrmehlmaterials (n = 5) nachgewiesen (siehe Abbildung 19). In der Negativkontrolle, bei der die cDNA durch Reinstwasser ersetzt wurde, konnte keine mRNA nachgewiesen werden. Der Nachweis von RNA wurde mit Hilfe von  $\beta$ MG erbracht. Eine adipogene Differenzierung der Bohrmehlzellen wurde mit PPAR $\gamma$ -Primern als Positivkontrolle bewiesen. Dabei war ein positives Ergebnis zu verzeichnen.

##### **chondrogen differenzierte Stromazellen**

In chondrogen differenzierten Zellen des Bohrmehls (n = 5) wurde CRLR-mRNA als einzelne, saubere Bande mit der erwarteten Größe von 147 bp nachgewiesen (siehe Abbildung 20). Reinstwasser ersetzte in einer Negativkontrolle die cDNA, wobei kein Nachweis einer mRNA möglich war. Um die Effizienz der RNA-Isolierung und der cDNA-Synthese zu beweisen, wurde  $\beta$ MG als Biomarker verwendet. Primer für

Agg dienten als Positivkontrolle für den Nachweis der chondrogenen Differenzierung. Hierbei zeigte sich ein positives Ergebnis.

#### **osteogen differenzierte Stromazellen**

In osteogenem Bohrmehlmaterial ( $n = 5$ ) konnte in vier von fünf Proben CRLR-mRNA als einzelne, saubere Bande mit einer erwarteten Größe von 147 bp nachgewiesen werden (siehe Abbildung 21). In der Negativkontrolle wurde die cDNA durch Reinstwasser ersetzt. Dabei konnte keine mRNA nachgewiesen werden. Als Biomarker für den Nachweis von RNA diente das  $\beta$ MG. Dem Nachweis einer osteogenen Differenzierung dienten als Positivkontrolle Primer für OPN. Sowohl für  $\beta$ MG als auch für OPN gelang der Nachweis.

### **3.4.2 RAMP 1**

#### **undifferenzierte multipotente Stromazellen**

RAMP 1-mRNA wurde als einzelne, saubere Bande mit einer erwarteten Größe von 156 bp in undifferenzierten Bohrmehlzellen ( $n = 5$ ) nachgewiesen (siehe Abbildung 18). In der Negativkontrolle, bei der die cDNA durch Reinstwasser ersetzt wurde, konnte keine mRNA nachgewiesen werden. Primer für  $\beta$ MG wurden zum Nachweis von RNA eingesetzt und erfolgreich nachgewiesen. CD90 konnte in den undifferenzierten Zelllinien nachgewiesen werden. Die Primer wurden als Positivkontrolle eingesetzt.

#### **adipogen differenzierte Stromazellen**

In vier von fünf Proben der Bohrmehlzellen, die einer adipogenen Differenzierung unterzogen wurden ( $n = 5$ ), konnte RAMP 1-mRNA als einzelne, saubere Bande mit einer erwarteten Größe von 156 bp nachgewiesen werden (siehe Abbildung 19). In der Negativkontrolle wurde die cDNA durch Reinstwasser ersetzt und ein Nachweis konnte nicht erfolgen. Das Vorhandensein von RNA wurde mittels  $\beta$ MG überprüft und gezeigt. Ein Nachweis der adipogenen Differenzierung erfolgte mit Primern des

PPAR $\gamma$ , die zur Positivkontrolle eingesetzt wurden. Hierbei wurde ein positives Ergebnis verzeichnet.

#### **chondrogen differenzierte Stromazellen**

In chondrogen differenzierten Zellen des Bohrmehls ( $n = 5$ ) wurde in vier von fünf Proben RAMP 1-mRNA als einzelne, saubere Bande mit der erwarteten Größe von 156 bp nachgewiesen (siehe Abbildung 20). Der Ersatz der cDNA durch Reinstwasser ermöglichte die Negativkontrolle und ein Nachweis der mRNA war nicht zu eruieren. Dem Nachweis von RNA dienten Primer für  $\beta$ MG. Als Nachweismarker für die chondrogene Differenzierung wurde Agg zur Positivkontrolle zu Hilfe gezogen. Sowohl der Nachweis von RNA als auch die Differenzierung in chondrogenes Material wurde im Versuch erfolgreich bewiesen.

#### **osteogen differenzierte Stromazellen**

Die mRNA für RAMP 1 wurde in vier von fünf Proben des osteogen differenzierten Zellmaterials des Bohrmehls ( $n = 5$ ) als einzelne, saubere Bande mit einer erwarteten Größe von 156 bp nachgewiesen (siehe Abbildung 21). In der Negativkontrolle erfolgte kein Nachweis einer mRNA, da die cDNA durch Reinstwasser ersetzt wurde. Als Biomarker für den Nachweis von RNA dienten Primer für  $\beta$ MG. Das Vorhandensein von RNA wurde somit bestätigt. Primer für OPN dienten als Positivkontrolle dem Beweis einer erfolgreichen osteogenen Differenzierung der Bohrmehlzellen.

### **3.4.3 RAMP 2**

#### **undifferenzierte multipotente Stromazellen**

In undifferenzierten Bohrmehlzellen ( $n = 5$ ) konnte die RAMP 2-mRNA als einzelne, saubere Bande mit einer erwarteten Größe von 167 bp nachgewiesen werden (siehe Abbildung 18). In der Negativkontrolle wurde die cDNA durch Reinstwasser ersetzt. Ein Nachweis von mRNA erfolgte in diesem Versuch nicht.

Als Biomarker für den Nachweis von RNA diene das  $\beta$ MG. Hierbei konnte eindeutig das Vorhandensein von mRNA gezeigt werden. Primer für CD90 wurden als Positivkontrolle eingesetzt und konnten in den undifferenzierten Zelllinien nachgewiesen werden.

#### **adipogen differenzierte Stromazellen**

Als einzelne, saubere Bande mit einer erwarteten Größe von 167 bp wurde RAMP 2-mRNA in adipogenem Bohrmehlmaterial (n = 5) nachgewiesen (siehe Abbildung 19). Reinstwasser ersetzte in einer Negativkontrolle die cDNA. Hierbei wurde kein Vorhandensein von mRNA gezeigt.  $\beta$ MG bewies die Existenz von RNA in den untersuchten Proben. Eine adipogene Differenzierung der Bohrmehlzellen konnte mit Hilfe des PPAR $\gamma$ -Primers als Positivkontrolle gezeigt werden.

#### **chondrogen differenzierte Stromazellen**

In chondrogen differenzierten Zellen des Bohrmehls (n = 5) konnte RAMP 2-mRNA als einzelne, saubere Bande mit einer erwarteten Größe von 167 bp nachgewiesen werden (siehe Abbildung 20). In der Negativkontrolle wurde die cDNA durch Reinstwasser ersetzt. Die mRNA wurde in diesem Versuch nicht nachgewiesen. Als Biomarker für ein Vorhandensein von RNA dienten  $\beta$ MG-Primer. Primer für Agg kamen zur Positivkontrolle eines Nachweises für eine chondrogene Differenzierung zum Einsatz. Agg und  $\beta$ MG zeigten positive Ergebnisse.

#### **osteogen differenzierte Stromazellen**

RAMP 2-mRNA wurde als einzelne, saubere Bande mit einer erwarteten Größe von 167 bp in osteogenem Bohrmehlmaterial (n = 5) nachgewiesen (siehe Abbildung 21). Der Austausch der cDNA durch Reinstwasser erfolgte in der Negativkontrolle, wobei kein Nachweis von mRNA zu beobachten war. Zur Kontrolle der Effizienz der RNA-Isolierung und cDNA-Synthese dienten Primer für  $\beta$ MG. Es zeigte sich im Folgenden, dass diese vorausgegangenen Schritte erfolgreich durchgeführt wurden und RNA in den untersuchten Proben vorhanden war. Primer für OPN dienten als

Positivkontrolle dem Nachweis einer osteogenen Differenzierung der Zellen des Bohrmehls.

### **3.4.4 RAMP 3**

#### **undifferenzierte multipotente Stromazellen**

In Bohrmehlzellen ( $n = 5$ ), die keiner Differenzierung unterzogen wurden, konnte keine RAMP 3-mRNA nachgewiesen werden (siehe Abbildung 18). Zur Positivkontrolle wurde im humanen Dottersack eine einzelne, saubere Bande mit einer erwarteten Größe von 165 bp gezeigt (siehe Abbildung 17). Als Biomarker für den Nachweis von RNA diente das  $\beta$ MG. Es erfolgte der Beweis eines positiven Ergebnisses. Primer für CD90 wurden als Positivkontrolle zum Einsatz gebracht und konnten in den undifferenzierten Zelllinien nachgewiesen werden.

#### **adipogen differenzierte Stromazellen**

Adipogen differenzierte Zellen des Bohrmehls ( $n = 5$ ) zeigten kein Vorhandensein von RAMP 3-mRNA (siehe Abbildung 19), während in der cDNA von Zellen des humanen Dottersacks mRNA des RAMP 3 in einer einzelnen, sauberen Bande mit erwarteter Größe von 165 bp nachgewiesen werden konnte (siehe Abbildung 17). Primer des  $\beta$ MG dienten als Biomarker dem Nachweis von RNA. PPAR $\gamma$ -Primer kamen als Positivkontrolle zum Nachweis einer adipogenen Differenzierung zum Einsatz. Hierbei konnte mRNA nachgewiesen werden.

#### **chondrogen differenzierte Stromazellen**

RAMP 3-mRNA wurde nicht in chondrogenem Bohrmehlmaterial ( $n = 5$ ) nachgewiesen (siehe Abbildung 20). Als Positivkontrolle wurde im humanen Dottersack eine einzelne, saubere Bande mit einer erwarteten Größe von 165 bp gezeigt (siehe Abbildung 17). Als Biomarker für den Nachweis von RNA diente das  $\beta$ MG. Zum Nachweis für die chondrogene Differenzierung des untersuchten Zellmaterials kam Agg als Positivkontrolle zum Einsatz. Dabei konnte bewiesen

werden, dass RNA vorhanden war und sich das Zellmaterial in chondrogene Richtung ausdifferenziert hatte.

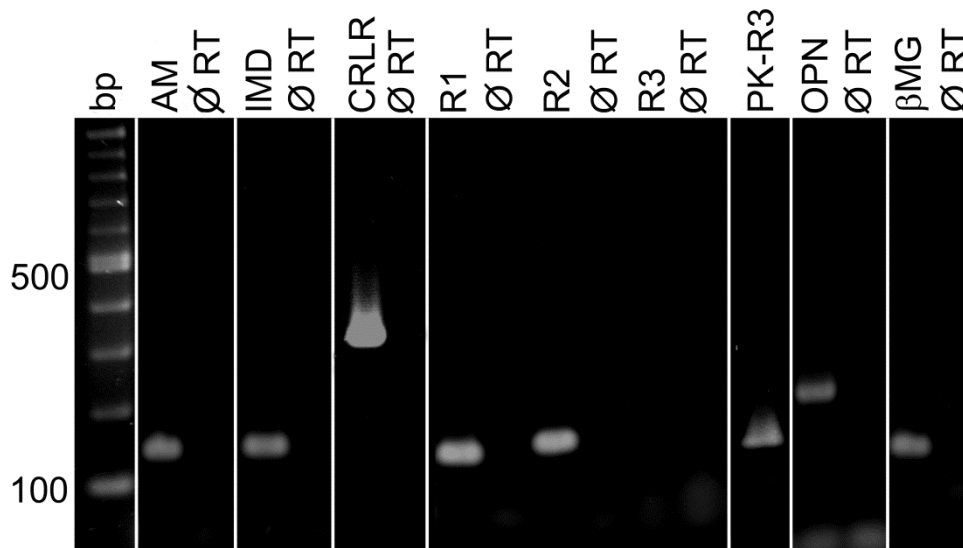
### **osteogen differenzierte Stromazellen**

Kein Nachweis von RAMP 3-mRNA konnte in osteogen differenzierten Zellen des Bohrmehls ( $n = 5$ ) erfolgen (siehe Abbildung 21). In Zellen des humanen Dottersacks wurde hingegen eine einzelne, saubere Bande mit der erwarteten Größe von 165 bp nachgewiesen (siehe Abbildung 17). Primer für  $\beta$ MG wurden als Nachweis der RNA zu Hilfe gezogen. Primer für OPN dienten als Positivkontrolle der osteogenen Differenzierung der Bohrmehlzellen. Beide Primer ließen ein positives Ergebnis verzeichnen.

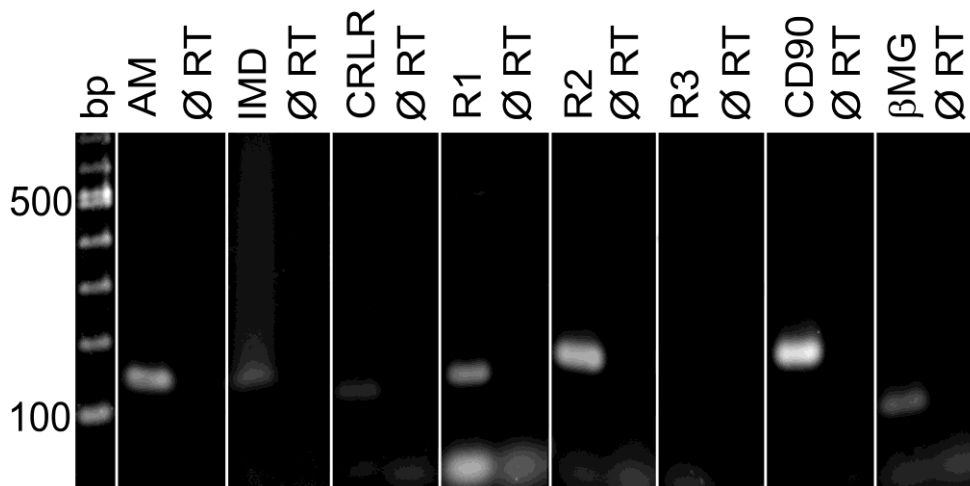
	IMD	AM	RAMP 1	RAMP 2	RAMP 3	CRLR
<b>TE 85, I</b>	+	+	+	+	-	+
<b>TE 85, II</b>	+	+	+	+	-	
<b>TE 85, III</b>	+	+	+	+	-	
<b>TE 85, IV</b>	+	+	+	-	-	
<b>TE 85, V</b>	+	+	-	+	-	+
<b>ZK 17, undifferenziert</b>	+	-	+	+	-	-
<b>ZK 18, undifferenziert</b>	+	+	+	+	-	+
<b>ZK 19, undifferenziert</b>	+	+	+	+	-	+
<b>ZK 20, undifferenziert</b>	+	+	+	+	-	+
<b>ZK 21, undifferenziert</b>	+	+	+	+	-	+
<b>ZK 17, osteogen</b>	+	+	-	+	-	+
<b>ZK 18, osteogen</b>	+	+	+	+	-	+
<b>ZK 19, osteogen</b>	+	+	+	+	-	+
<b>ZK 20, osteogen</b>	+	-	+	+	-	+
<b>ZK 21, osteogen</b>	+	+	+	+	-	-
<b>ZK 17, adipogen</b>	+	+	+	+	-	+
<b>ZK 18, adipogen</b>	+	+	+	+	-	+
<b>ZK 19, adipogen</b>	+	+	-	+	-	-
<b>ZK 20, adipogen</b>	+	+	+	+	-	+
<b>ZK 21, adipogen</b>	-	+	+	+	-	+
<b>ZK 17, chondrogen</b>	+	+	+	+	-	+
<b>ZK 18, chondrogen</b>	+	+	-	+	-	+
<b>ZK 19, chondrogen</b>	+	+	+	+	-	+
<b>ZK 20, chondrogen</b>	+	+	+	+	-	+
<b>ZK 21, chondrogen</b>	-	-	+	+	-	+

**Tabelle 4:** Zusammenfassung der Ergebnisse von IMD, AM, RAMP 1-3 und CRLR für den Nachweis in der Osteosarkomzelllinie TE 85 und den multipotenten Stromazellen. + = Nachweis erfolgt, - = nicht detektierbar.



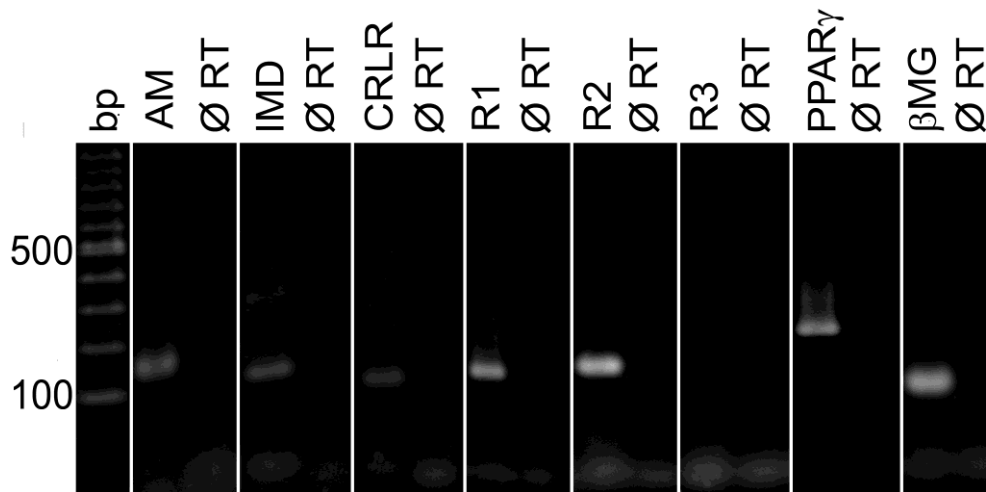


**Abbildung 17:** Agarosegel der RT-PCR zum Nachweis von Adrenomedullin (AM), Intermedin (IMD), CRLR und RAMP 1-3 (R1-3) in der Osteosarkomzelllinie TE 85. ØRT = cDNA-Synthese ohne Reverse Transkriptase. Zum Nachweis der osteogenen Differenzierung diente Osteopontin (OPN) und als housekeeping-Primer wurde beta-Mikroglobulin (βMG) verwendet. PK-R3 stellt die Positivkontrolle des RAMP 3 im Dottersack dar. Es zeigt sich in der Gelelektrophorese, dass AM, IMD, CRLR, R1, R2, OPN und βMG in der Osteosarkomzelllinie TE 85 eindeutig nachweisbar sind. R3 konnte hingegen in TE 85-Zellen nicht nachgewiesen werden. Die Banden unterhalb der 100 bp-Markierung stellen Primerdimere dar. Dabei handelt es sich um nicht umgesetzte Primer. Dieses Phänomen lässt sich deshalb auch in der ØRT beobachten.

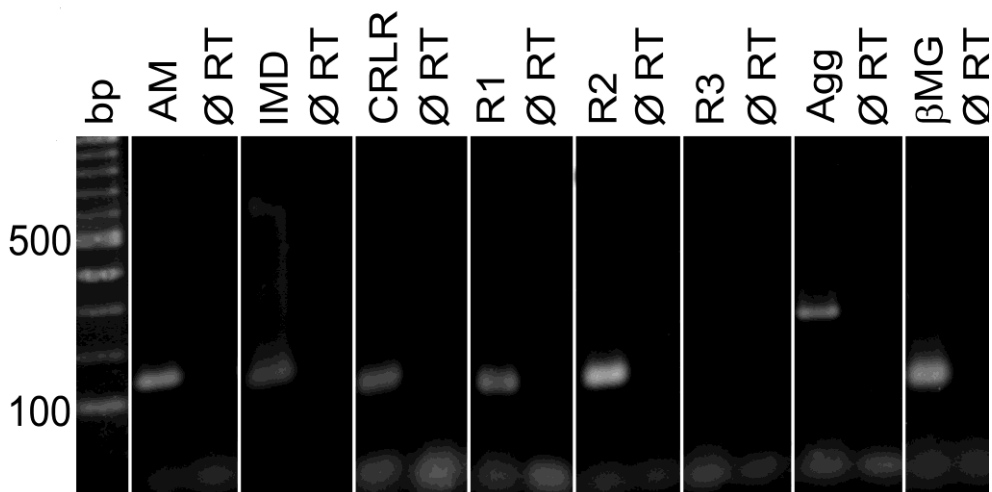


**Abbildung 18:** Agarosegel der RT-PCR zum Nachweis von Adrenomedullin (AM), Intermedin (IMD), CRLR und RAMP 1-3 (R1-3) in undifferenzierten multipotenten Stromazellen. ØRT = cDNA-Synthese ohne Reverse Transkriptase. Marker für CD90 dienten als Positivkontrolle, zum Nachweis von RNA wurde beta-Mikroglobulin (βMG) verwendet. Es zeigt sich in der Gelelektrophorese, dass AM, IMD, CRLR, R1, R2, CD90 und βMG im undifferenzierten Bohrmehlmaterial eindeutig nachweisbar sind. R3 konnte hingegen nicht in den undifferenzierten Bohrmehlzellen nachgewiesen werden. Die Banden unterhalb der 100 bp-Markierung stellen Primerdimere dar. Dabei handelt es sich um nicht umgesetzte

*Primer. Aus diesem Grund lässt sich dieses Phänomen auch in der ØRT beobachten.*

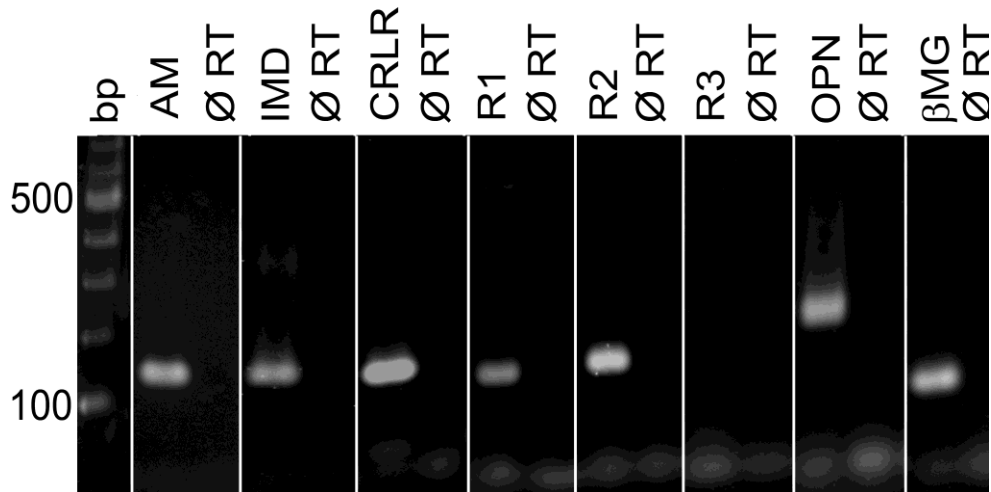


**Abbildung 19:** Agarosegel der RT-PCR zum Nachweis von Adrenomedullin (AM), Intermedin (IMD), CRLR und RAMP 1-3 (R1-3) in adipogen differenzierten Stromazellen. ØRT = cDNA ohne Reverse Transkriptase. Der Erfolg der adipogenen Differenzierung wurde mit PPAR $\gamma$  bewiesen,  $\beta$ MG diente dem housekeeping. Es zeigt sich in der Gelelektrophorese, dass AM, IMD, CRLR, R1, R2, PPAR $\gamma$  und  $\beta$ MG im adipogen differenzierten Bohrmehlmateriale eindeutig nachweisbar sind. R3 konnte hingegen nicht in den differenzierten Bohrmehlzellen nachgewiesen werden. Die Banden unterhalb der 100 bp-Markierung stellen Primerdimere dar. Dabei handelt es sich um nicht umgesetzte Primer. Dieses Phänomen lässt sich deshalb auch in der ØRT beobachten.



**Abbildung 20:** Agarosegel der RT-PCR zum Nachweis von Adrenomedullin (AM), Intermedin (IMD), CRLR und RAMP 1-3 (R1-3) in chondrogen differenzierten Stromazellen, ØRT = cDNA-Synthese ohne Reverse Transkriptase. Agg konnte zum Nachweis der erfolgten chondrogenen Differenzierung des Zellmaterials genutzt werden. Es zeigt sich in der Gelelektrophorese, dass AM, IMD, CRLR, R1, R2, Agg und  $\beta$ MG im chondrogen differenzierten Bohrmehlmateriale eindeutig nachweisbar

sind. R3 konnte hingegen nicht in den differenzierten Bohrmehlzellen nachgewiesen werden. Die Banden unterhalb der 100 bp-Markierung stellen Primerdimere dar. Dabei handelt es sich um nicht umgesetzte Primer. Dieses Phänomen lässt sich deshalb auch in der ØRT beobachten.



**Abbildung 21:** Agarosegel zum Nachweis von Adrenomedullin (AM), Intermedin (IMD), CRLR und RAMP 1-3 (R1-3) in osteogen differenzierten Stromazellen, ØRT = cDNA-Synthese ohne Reverse Transkriptase. Der Nachweis der osteogenen Differenzierung erfolgte mittels Osteopontin (OPN). Es zeigt sich in der Gelelektrophorese, dass AM, IMD, CRLR, R1, R2, OPN und βMG (als housekeeping) im osteogen differenzierten Bohrmehlmaterial eindeutig nachweisbar sind. R3 konnte hingegen nicht in den differenzierten Bohrmehlzellen nachgewiesen werden. Die Banden unterhalb der 100 bp-Markierung stellen Primerdimere dar. Dieser Nachweis lässt sich auch in der ØRT erbringen, da es sich um nicht umgesetzte Primer handelt.

### **3.5 real-time RT-PCR der multipotenten Stromazellen**

#### **3.5.1 Etablierung der Primer und Bedingungen der real-time PCR**

##### **Beta-Mikroglobulin**

Zur Etablierung des humanen  $\beta$ MG-Primers wurde gepoolte cDNA der multipotenten Stromazellen des Bohrmehlmaterials verwendet. Zur visuellen Veranschaulichung diente auch hier ein logarithmisches Diagramm, auf dessen Achsen die Fluoreszenzwerte und die Anzahl der abgelaufenen Zyklen gegeneinander aufgetragen wurden. Aus diesen Werten errechnet sich nun die Effizienz der PCR, die bei 100,6% liegt und der Korrelationskoeffizient, welcher 0,996 beträgt. Des Weiteren wurde eine Schmelzkurvenanalyse durchgeführt, um sicher zwischen unspezifischen Abschnitten und spezifischen Genprodukten unterscheiden zu können. Aus dieser Analyse ergaben sich für jedes Genprodukt die jeweiligen Schmelztemperaturen, bei denen sich der gebundene Fluoreszenzfarbstoff wieder aus der DNA löste. Bei einer Temperatur von 81°C erreichte die Schmelzkurve ihren Maximalwert. In den Negativkontrollen zeigte sich erwartungsgemäß kein PCR-Nachweis.

##### **Adrenomedullin**

Gepoolte cDNA der Stromazellen diente auch hier der Etablierung des humanen Primers für AM. Wobei ein Teil der Bohrmehlzellen zur Kultivierung unter hypoxischen Bedingungen bebrütet wurde. Die Zellproben, die unter Normoxie lagerten, wurden zur Hälfte mit FKS genährt, die andere Hälfte bekam dieses Serum nicht zugeführt. Um den qualitativen Nachweis für AM in den Stromazellen zu erbringen, wurde eine RT-PCR durchgeführt, bei der sich, wie erwartet, bei einer Bande von 155 bp AM nachweisen lies. Die Negativkontrolle war frei von AM-cDNA. Nun konnte anhand der logarithmischen Grafik eine PCR-Effizienz von 100,1% errechnet werden und ein Korrelationskoeffizient von 0,988. Die durchgeführte Schmelzkurvenanalyse zeigte ihren Maximalwert bei einer

Schmelztemperatur von 88°C. Ein PCR-Produkt in der Negativkontrolle war nicht nachzuweisen.

### Intermedin

Zur Etablierung des humanen Primers für IMD diente gepoolte cDNA der Bohrmehlzellen. Bei einer Bande von 156 bp konnte IMD in diesen Zellen mit Hilfe der RT-PCR qualitativ nachgewiesen werden. Die cDNA von IMD konnte in der Negativkontrolle nicht nachgewiesen werden. Die Standardgerade der real-time RT-PCR ergab nun eine Effizienz der PCR von 86,3% und einen Korrelationskoeffizienten von 0,997. Der Schmelzpunkt für IMD lag bei 91°C. Die Kontrolle durch Reinstwasser war negativ.

## 3.5.2 Ergebnisse der real-time PCR

### Adrenomedullin

Um die mRNA-Expression von AM zu quantifizieren, wurde der dCT-Wert ermittelt. Hierfür wurde vom CT-Wert des AM der CT-Wert des housekeeping-Gens subtrahiert (siehe Tabelle 5).

Zelllinien	dCT = CT-Wert AM – CT-Wert $\beta$ MG		
	Normoxie (+FKS)	Normoxie (-FKS)	Hypoxie (-FKS)
ZK 20	4,685	3,485	1,115
ZK 22	5,465	5,815	1,855
ZK 23	3,910	3,690	0,945
ZK 24	3,405	2,860	1,265
ZK 25	5,090	5,000	2,065
ZK 18	3,105	4,385	4,045
ZK30	3,790	3,390	3,225

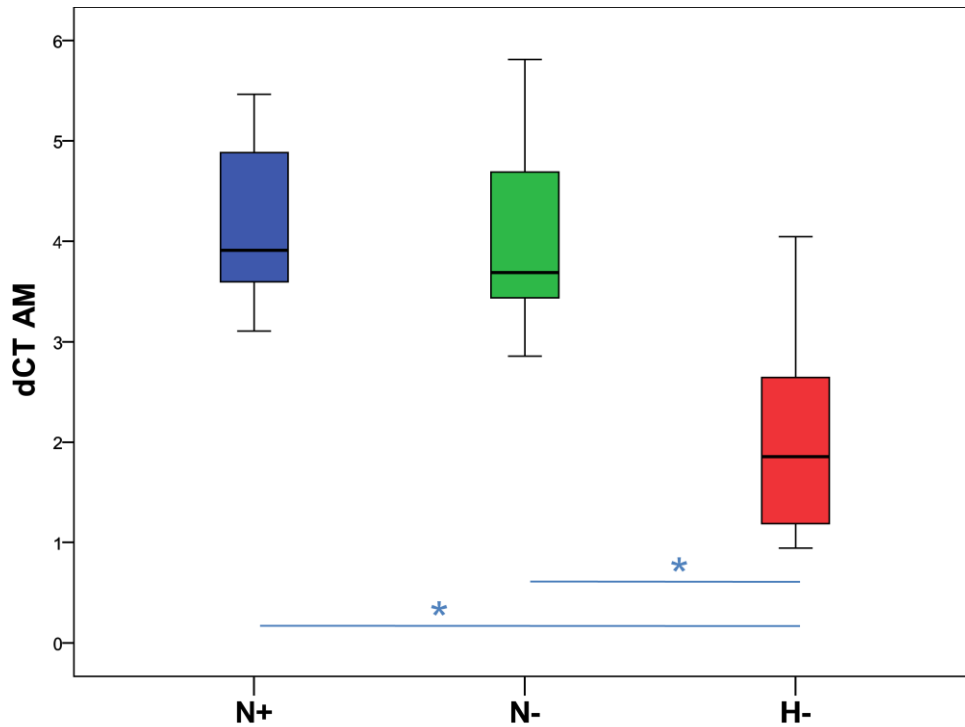
**Tabelle 5:** Ermittelte dCT-Werte für AM.

Die ermittelten dCT-Werte für AM der humanen Stromazellen unter Hypoxie und Normoxie (mit und ohne FKS) wurden nun anhand von Boxplot-Darstellungen grafisch veranschaulicht und statistisch miteinander verglichen.

Dabei ist zu erwähnen, dass ein niedriger Wert in den Boxplots eine Hochregulation der untersuchten Peptide verdeutlicht. Dieser Sachverhalt kommt dadurch zustande, da bereits nach wenigen durchlaufenen Zyklen viel RNA entstanden ist.

Stellt man nun den Vergleich der dCT-Werte zwischen den Stromazellen unter Normoxie, jeweils mit und ohne die Zugabe von FKS, so ergibt sich im Mann-Whitney-Test ein Wert von  $p = 0,710$ . Dies entspricht keiner statistischen Signifikanz.

Vergleicht man aber die Werte unter Normoxie mit denen unter Hypoxie ergeben sich jeweils durchaus signifikante Unterschiede von  $p = 0,011$ . Die Werte unter hypoxischen Bedingungen waren somit geringer, als die unter normoxischen, was wiederum bedeutet, dass das Treshold-Level bereits nach wenigen PCR-Zyklen erreicht war. Daraus lässt sich schlussfolgern, dass aus den Proben unter Hypoxie relativ mehr cDNA extrahiert werden konnte, als aus denen, die der Normoxie ausgesetzt waren. Die Expression von AM lies sich demzufolge durch Hypoxie hochregulieren. Von untergeordneter Bedeutung hingegen war das Vorhandensein von FKS (siehe Abbildung 22).



**Abbildung 22:** Boxplot der dCT-Werte von AM. Verglichen wurde die Expression von AM in multipotenten Stromazellen unter Hypoxie und Normoxie. N+ = Normoxie und Zugabe von FKS, N- = Normoxie ohne Zugabe von FKS, H- = Hypoxie ohne FKS. Es zeigt sich, dass AM unter Hypoxie hochreguliert wird. \* entspricht  $p \leq 0,05$ .

## Intermedin

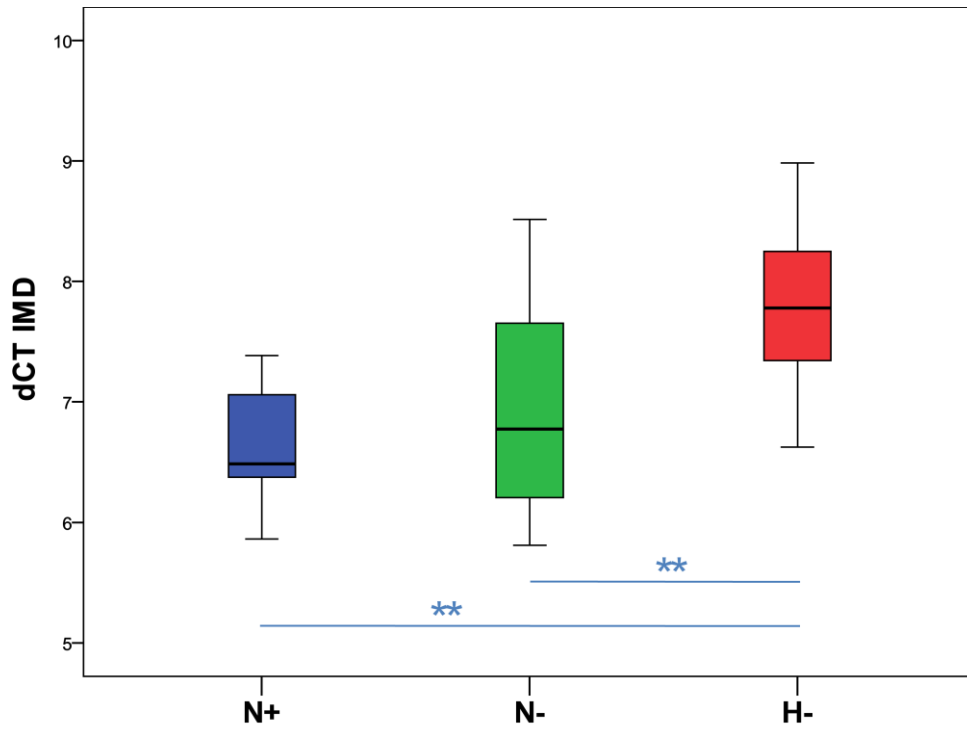
Zur Quantifizierung der mRNA-Expression von IMD, wurde der dCT-Wert ermittelt. Hierfür wurde vom CT-Wert des IMD der CT-Wert des housekeeping-Gens subtrahiert (siehe Tabelle 6).

Zelllinien	dCT = CT IMD – CT BMG		
	Normoxie (+FKS)	Normoxie (-FKS)	Hypoxie (-FKS)
ZK 20	5,865	6,790	7,845
ZK 22	6,850	6,015	7,777
ZK 23	6,355	5,813	7,335
ZK 24	6,400	6,400	8,655
ZK 25	7,270	6,775	8,985
ZK 18	7,385	10,000	7,353
ZK30	6,485	8,515	6,625

**Tabelle 6:** *Ermittelte dCT-Werte für IMD.*

Stellt man die dCT-Werte von IMD unter Normoxie gegenüber, so zeigt sich kein signifikanter Unterschied bei Zugabe von FKS ( $p = 0,548$ ). Beim Vergleich der Werte unter Hypoxie und unter Normoxie kann hingegen eine statistisch hohe Signifikanz ( $p = 0,008$ ) erhoben werden. So zeigt sich eine verminderte Expression von IMD unter den Bedingungen einer Hypoxie. Ebenfalls irrelevant war das Vorhandensein von FKS (siehe Abbildung 23).





**Abbildung 23:** Boxplot der dCT-Werte von IMD. Verglichen wurde die Expression von IMD in multipotenten Stromazellen unter Hypoxie und Normoxie. N+ = Normoxie und Zugabe von FKS, N- = Normoxie ohne Zugabe von FKS, H- = Hypoxie ohne FKS. Es zeigt sich, dass IMD unter Hypoxie herunterreguliert wird. \*\* entspricht  $p \leq 0,01$ .

## **4 Diskussion**

### **4.1 Adrenomedullin und Intermedin in der Osteosarkomzelllinie TE 85 sowie multipotenten Stromazellen**

Das Vorkommen der beiden jüngsten Peptide der Calcitoninpeptidfamilie in TE 85 und multipotenten Stromazellen stand im Mittelpunkt meiner Arbeit.

Dabei konnten folgende Beobachtungen während der Untersuchungen gemacht werden: Sowohl in der Osteosarkomzelllinie als auch in den Zellen des Bohrmehls war eindeutig ein Nachweis für mRNA von AM und IMD zu erbringen. Nicht nur die undifferenzierten Stromazellen, sondern auch das adipogene, chondrogene und osteogene Zellmaterial wies AM und IMD in der erfolgten RT-PCR auf.

In den Literaturrecherchen zeigte sich, dass bis zum jetzigen Zeitpunkt noch keinerlei Untersuchungen bezüglich des Vorhandenseins von IMD und AM in humanen Osteosarkomzellen liefen. Auch eine Analyse von Bohrmehl auf die beiden Peptide wurde bisher noch nicht durchgeführt. Somit stellen diese vorliegenden Ergebnisse die erste Dokumentation auf diesem Gebiet dar.

#### **4.1.1 Adrenomedullin**

Der Nachweis der Expression von AM erfolgte mit Hilfe der RT-PCR. Dazu wurde RNA von osteogen, chondrogen und adipogen differenzierten Bohrmehlzellen sowie von Osteosarkomzellen gewonnen.

Die vorliegenden Untersuchungen belegten, dass mRNA von AM in allen verwendeten Zellkulturen nachzuweisen war.

Bisher konnte das Vorhandensein von AM in humanen Knochenzellen noch nicht belegt werden.

Lediglich Forschungen an Ratten- und Mäusematerial war aus verschiedenen Studien zu eruieren. Dort wurde festgestellt, dass AM die Expression von Osteoblasten

hochreguliert und es nach lokaler Verabreichung von AM zu einer Vergrößerung der Knochenmineralisationszone kommt (Naot et al. 2008). Dabei wurde AM ausgewachsenen Mäusen täglich in einer Konzentration von  $10^{-11}$  M bis  $10^{-12}$  M injiziert. Außerdem wurde gezeigt, dass AM rein über Osteoblastenproliferation seine Wirkung entfaltet und nicht, wie beispielsweise Amylin und CGRP, über die Knochenresorption (Cornish et al. 2001, Lerner 2006). Yun et al. beobachteten allerdings, dass AM die cytokinabhängige Osteoklastenentstehung hemmt und im Rattenmodell einer Rheumatoiden Arthritis vorbeugt (Yun et al. 2008).

Allgemeingültig scheint zu sein, dass AM eine anabole Wirkung auf den Knochen aufweist, indem es das Knochenwachstum in vitro und in vivo enthemmt (Cornish et al. 2001, Lerner 2006).

AM konnte in Osteoblastenkulturen (MC3T3) ein antiapoptotischer Effekt nachgewiesen werden, was die Tatsache unterstützt, dass es auf die Knochenresorption keinerlei Einfluss hat (Uzan et al. 2008).

Bei diesen Aussagen ist festzustellen, dass das AM mit seiner protektiven Wirkung auf den Knochen eine Therapiemöglichkeit der Volkskrankheit Osteoporose darzustellen scheint. Cornish wies dementsprechend nach, dass der Knochen nach Stimulation mit AM signifikant dichter und härter war (Cornish et al. 2001).

In adipogen differenzierten Bohrmehlzellen konnte ebenfalls mRNA von AM nachgewiesen werden. Anhand von Literaturrecherchen konnte festgestellt werden, dass bereits einige Untersuchungen zum Vorkommen von AM in Fettgewebe durchgeführt wurden. So wurde AM in subkutanem Fettgewebe von Maus und Mensch nachgewiesen (Nambu et al. 2005, Paulmyer-Lacroix et al. 2006). Nambu beschrieb in seiner Studie, dass das Fettgewebe eine Quelle für AM darstellt und ein eindeutiger Zusammenhang zwischen der AM-Expression und einem bestehenden Übergewicht in Mausmodellen nachgewiesen werden konnte (Nambu et al. 2005). Außerdem war zu erkennen, dass der Plasmaspiegel von AM bei Frauen mit einem hohen Fettanteil deutlich erhöht war (Iemura-Inaba et al. 2008). Harmaney zeigte, dass es eine positive Korrelation zwischen dem AM-Spiegel im Fettgewebe und dem Body-Mass-Index (BMI) gibt (Harmaney et al. 2007). Insulin erwies sich in dieser Studie als Hemmer der AM-Ausschüttung. So konnte eine negative Korrelation zwischen dem AM-Plasmaspiegel und den Insulindosen im Plasma beobachtet werden. Fukai et al. beschrieben wiederum eine Hemmung der Insulinsekretion durch AM (Fukai et al. 2005).

Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass AM in Rattenadipozyten in das Geschehen von Adipogenese und Lipolyse eingreift, indem es den Fettabbau steigert (*Iemura-Inaba et al. 2008*). Durch diese Ergebnisse lässt sich dem AM im Bezug auf den Fettstoffwechsel eher eine katabole Wirkung nachweisen, da die Insulinproduktion runtergefahren wird und im Folgenden der Abbau von Fettgewebe stattfindet.

In den vorliegenden Untersuchungen gelang des Weiteren der Beweis für das Vorhandensein von AM in humanen Chondrozyten nach chondrogener Differenzierung von Bohrmehlzellen.

Auch in Chondrozyten von Mäuse- und Rattenembryonen konnte bereits mRNA von AM nachgewiesen werden (*Chosa et al. 2003, Cornish et al. 2001*). Dabei zeigte sich nach systemischer Verabreichung von AM in ausgewachsene Mäuse, dass die Proliferationsrate von Chondrozyten erhöht wurde und die Knorpelplatten sich verdichteten (*Cornish et al. 2001*). Hierbei bleibt zu vermuten, dass AM nicht nur im Knochen, sondern auch in Knorpelgewebe proliferative Wirkung entfaltet.

Der Nachweis von AM in Osteosarkomzellen konnte in den Untersuchungen ebenfalls erfolgen. Diese Tatsache könnte die mögliche Ursache für das schnelle Wachstum dieser Zellkultur erklären. Diesbezüglich wurde bereits vermutet, dass AM nicht, wie alle anderen Peptide der Familie, die Knochenresorption hemmt, sondern den Knochenstoffwechsel rein über Stimulation der Osteoblasten reguliert (*Lerner 2006*). Wie bereits erwähnt, besitzen Osteosarkomzellen die ausgeprägteste Ähnlichkeit zu Osteoblasten und könnten somit der steten Proliferation, die durch AM angeregt wird, unterliegen. Im Knochenwachstum scheint AM das potenteste Peptid aus der Calcitoninpeptidfamilie zu sein.

Somit bestätigen die hier dargestellten Ergebnisse mit den bereits vorliegenden Studien, dass AM einen lokalen Regulator des Knochenwachstums darstellt und durch sein anaboles Auftreten die Neubildung von Knochen und vermutlich auch Knorpel anregt.

#### 4.1.2 Intermedin

Mit Hilfe der RT-PCR gelang erstmals der Nachweis dafür, dass mRNA für IMD sowohl in der Osteosarkomzelllinie TE 85 als auch in Bohrmehlmaterial zu finden ist. Für multipotente Stromazellen und für differenzierte Zellen des Bohrmehls (osteogen, chondrogen und adipogen) gelang gleichermaßen der Beweis.

Bisher wurde in noch keiner Studie diese Tatsache festgehalten. IMD konnte weder in vivo noch in vitro in Knochenmaterial identifiziert werden. 2011 gelang es der Arbeitsgruppe um Granholm zu zeigen, dass IMD die Knochenresorption in Calvarien von Nagern hemmt. Dies wird über eine Aktivitätshemmung der Osteoklasten hervorgerufen (*Granholm et al. 2011*).

Da IMD mit 26% Sequenzhomologie dem AM aus der Calcitoninpeptidfamilie am ähnlichsten ist und belegt ist, dass es genau wie AM über den CRLR wirkt, liegt die Schlussfolgerung nahe, dass es auch ähnliche Wirkung wie dieses Peptid hat. Bis zur Lieferung von weiteren Nachweisen bleiben alle Vermutungen allerdings nur Spekulationen.

Welche Rolle beim Zusammenspiel von CRLR und IMD die RAMPs dabei spielen, wird noch spekuliert.

Ob IMD rein über Stimulation oder auch über Knochenresorption wirkt, bleibt außerdem zu klären.

Da der Knochenumbau aber über systemische und lokale Faktoren reguliert wird, scheinen die vorliegenden Ergebnisse allerdings die Aussage zu untermauern, dass auch das erst entdeckte IMD einen solchen lokalen Regulator darstellt und wie AM den Aufbau des Knochens anregt.

Auch im Knorpel scheint das IMD eine protektive Wirkung zu haben, da ein Nachweis der mRNA auch hier gelang.

Welche Position das IMD im Fettgewebe einnimmt, bleibt eine weitere interessante Frage, der es sich nachzugehen lohnt, da auch hier der Beweis für die Existenz von IMD glückte.

## 4.2 CRLR und RAMPs in der Osteosarkomzelllinie TE 85 sowie multipotenten Stromazellen

Ein Punkt der Fragestellung der vorliegenden Arbeit bezog sich auf die Wirkungsweise der beiden Peptide und ihre Affinität zu den Rezeptoren. Sowohl IMD als auch AM entfalten in den untersuchten Zellen von Bohrmehl und TE 85 über den CRLR ihr Wirkung. Bei diesem Rezeptor handelt es sich um einen G-Protein-gekoppelten Rezeptor (*Pondel 2000*).

1993, zwei Jahre nach Entdeckung des CR, über den Calcitonin und Amylin wirken, wurde der CRLR erstmals kloniert und seine Ähnlichkeit zum CR festgestellt (*Naot et al. 2008*).

In den vorliegenden Untersuchungen wurde mit Hilfe der RT-PCR die mRNA von CRLR in den differenzierten (adipogen, chondrogen und osteogen) und undifferenzierten Bohrmehlzellen nachgewiesen.

Diese Tatsache, dass CRLR möglicherweise in humanem Bohrmehlmateriale zu finden ist, wurde damit erstmalig experimentell untersucht und bewiesen.

Aus diesem Resultat lässt sich schlussfolgern, dass IMD und AM ihre Aktivität über den CRLR vermitteln, wie schon in früheren Forschungsansätzen an anderen Gewebearten des tierischen und menschlichen Organismus vermutet wurde (siehe Kapitel 1.2.5) (*Gorn et al. 1992, McLatchie et al. 1998, Qi et al. 2008*).

Auch in Osteoblasten- und Osteoklastenkulturen konnte ein Nachweis für CRLR erbracht werden (*Nakamura et al. 2005, Naot et al. 2001*).

Durch die erfolgte Differenzierung der Zellen des Bohrmehls lässt sich mutmaßen, dass nicht nur in Knochengewebe sondern auch in Knorpel und Fettzellen IMD und AM durch den CRLR ihre Wirkung entfalten, jedoch existieren bisher keine weiteren Publikationen, die besagen, dass der CRLR in Chondrozytenkulturen zu finden ist. Da allerdings in der Vergangenheit gezeigt werden konnte, dass AM und IMD ihre Wirkung über den CRLR entfalten und in der vorliegenden Arbeit auch ein Nachweis in chondrogenen Kulturen gelang, liegt es nahe, dass der Wirkmechanismus auch hier über den CRLR zu erklären ist.

Fukai et al. untersuchten in einer Studie das Vorhandensein von CRLR und RAMPs in Adipozyten (*Fukai et al. 2005*). Dabei gelang ihnen der Nachweis des Rezeptors

und von RAMP 2. Diese Untersuchungen liefen an Fettgewebe verschiedener Entnahmestellen aus Ratten, wie zum Beispiel subkutanem und retroperitonealem Fett. Diese Ergebnisse und die vorliegenden Untersuchungen sind damit im Einklang und deuten darauf hin, dass das Vorkommen von CRLR vermuten lässt, dass auch im adipogenen Gewebe eine Kooperation von CRLR mit IMD und AM erfolgt. Dabei scheint ein Zusammenspiel des CRLR mit RAMP 2 wahrscheinlich. Außerdem ist eine weitere Verbindung des Rezeptors mit RAMP 1 aufgrund dieser Ergebnisse nicht auszuschließen. Eine Kommunikation des CRLR mit RAMP 3 scheint allerdings eher unwahrscheinlich, da der Beweis hierfür in den untersuchten Zellkulturen nicht gelang.

In der Osteosarkomzelllinie TE 85 konnte ebenfalls mRNA für den CRLR detektiert werden. Auch Togari gelang es mit seiner Arbeitsgruppe den CRLR in Osteosarkomzellen nachzuweisen. Dabei untersuchten sie die Zelllinien Saos-2, MG63 und auch die TE 85-Zelllinie. In Osteoblasten erfolgte in diesen Studien ebenfalls ein mRNA-Nachweis für den CGRP-Rezeptor (entspricht dem CRLR) (Togari *et al.* 1997). Naot *et al.* führten ihre Analysen an einer Osteoblastenzelllinie und einer Osteosarkomzelllinie (UMR 106-01) durch. Dabei fanden sie raus, dass CRLR in beiden Zellarten vorhanden war (Naot *et al.* 2008).

Ein Abstract von Kawase *et al.* aus dem Jahr 2005 beschreibt gleichermaßen eine Expression des CGRP-Rezeptors in der Osteosarkomzelllinie MG63 (Kawase *et al.* 2005).

Des Weiteren wurde in der vorliegenden Arbeit untersucht, welche RAMPs in den TE 85-Zellen und dem Bohrmehlmaterial nachzuweisen sind, da eine Wirkung des CRLR bisher nur unter Coexpression mit den RAMPs beschrieben wurde (Naot *et al.* 2008).

Bei diesen Untersuchungen wurde gezeigt, dass sowohl in der Osteosarkomzelllinie als auch in undifferenzierten sowie differenzierten Zellen des Bohrmehls ein Vorhandensein von RAMP 1 und RAMP 2 nachzuweisen war. Für RAMP 3 hingegen konnte nie ein Nachweis erfolgen. In der parallellaufenden Positivkontrolle (Zellen des Dottersacks) konnte aber problemlos ein Nachweis der mRNA von RAMP 3 erfolgen.

Diese Aussage lässt schlussfolgern, dass IMD und AM unter Anwesenheit von RAMP 1 und/oder RAMP 2 eine Bindung mit dem CRLR eingehen können.

Nakamura et al. konnten in ihren Studien zeigen, dass in isolierten Knochenzellen von Mäusen RAMP 2 und CRLR exprimiert werden, RAMP 1 und RAMP 3 hingegen waren nicht nachzuweisen (*Nakamura et al. 2005*). Bei der Untersuchung von Osteoblastenzelllinien und der Osteosarkomzelllinie UMR 106-01 fanden Naot et al. 2008 in der durchgeführten real-time PCR heraus, dass viel mRNA von RAMP 1, wenig von RAMP 2 und keine mRNA von RAMP 3 nachzuweisen war (*Naot et al. 2008*). Die real-time PCR ist ein Verfahren zur quantitativen Bestimmung der mRNA. Diese Aussagen von Naot über die Expression der RAMPs stimmen mit den Ergebnissen der vorliegenden Untersuchungen überein.

In einer Studie von Chang et al. wird beschrieben, dass die Affinität von AM zum CRLR am größten ist, wenn eine Coexpression mit RAMP 2 und RAMP 3 vorliegt (*Chang et al. 2004, Roh et al. 2004*). In den vorhandenen Ergebnissen ließ sich kein Nachweis für RAMP 3 verzeichnen, was die Tatsache überdenken ließe, ob AM in osteogenen, chondrogenen und adipogenen Zellen durch Bindung von RAMP 3 an den CRLR wirkt. Außerdem sollte überdacht werden, ob in Osteosarkomzellen ein Effekt des AM auf die Anwesenheit von RAMP 3 zurückzuführen ist, da keine mRNA für dieses Protein nachweislich war. Chang et al. (2004) beschreiben außerdem, dass sich auch IMD als spezieller Agonist für RAMP 1 und RAMP 3 erwies. Auch diese Aussage ließe sich abwägen, da die vorliegenden Ergebnisse keinen Nachweis von RAMP 3 erbrachten.

Lerner stellt in einer Studie fest, dass in Osteoklastenkulturen von Mäusen nur RAMP 2 aufzufinden war, RAMP 1 und 3 dagegen nicht (*Lerner 2006*).

Dass eine Coexpression von CRLR mit RAMP 1 oder RAMP 2 eine Bindung von AM an den Rezeptor verursacht, beschreibt die Forschungsgruppe um Bühlmann (*Bühlmann et al. 1999*). Zur Untersuchung wurden dabei die Zelllinien UMR-106 (osteoblast-like-cells) und eine Fibroblastenzelllinie (COS-7) aus Rattenspezies verwendet.

Dabei wird die größte Affinität von AM zum CRLR beschrieben, wenn RAMP 2 coexprimiert wird.

Beim IMD konnte bisher gezeigt werden, dass es bevorzugt eine Bindung mit einem CRLR in Kombination von RAMP 1 und RAMP 3 eingeht (*Chang et al. 2004, Roh et al. 2004*). Allerdings ist nach Roh et al. die Bindung geringer Mengen von IMD an CRLR in Kombination mit RAMP 2 nicht auszuschließen (*Roh et al. 2004*). In einer anderen Studie von Roh zeigte sich, dass IMD nicht zwischen den verschiedenen



RAMPs diskriminiert, sondern immer eine Bindung mit dem CRLR zu beobachten ist (Roh et al. 2004, Takei et al. 2004). Roh et al. untersuchten ihre Fragestellungen zum IMD an einer humanen Neuroblastomzelllinie (SK-N-MC) und an einer Myoblastenzelllinie aus Ratten (L6).

Abschließend ist zu erwähnen, dass belegt wurde, dass IMD und AM in den verschiedensten Gewebearten ihre Wirkung über den CRLR entfalten. Aufgrund der vorliegenden Untersuchungen könnte diese Schlussfolgerung somit auch für chondrogen, osteogen und adipogen differenzierte Zellen des Bohrmehls gezogen werden.

Was noch einer ausführlicheren Erforschung bedarf, ist die Zusammenarbeit des CRLR mit den RAMPs. Bei dieser Fragestellung wurden in der Vergangenheit von den verschiedenen Arbeitsgruppen unterschiedlichste Thesen aufgestellt. Ein Teil dieser stimmt mit den dargelegten Ergebnissen überein: Eine Wirkung von IMD und AM ist in Zusammenarbeit des CRLR mit RAMP 1 und RAMP 2 nachzuvollziehen. Andere Stimmen sprechen von unterschiedlichen Affinitäten dieser Peptide der RAMPs gegenüber. Weitere Forschungsgruppen wiederum vermuten kein selektives Auftreten der Calcitoninpeptidfamilie der RAMPs gegenüber (siehe Kapitel 1.2).

Somit konnte die vorliegende Arbeit zeigen, dass RAMP 1 und RAMP 2 in den Zellen des Bohrmehls (multipotente Stromazellen und differenzierte Stromazellen) und in TE 85-Zelllinien nachzuweisen war. RAMP 3 hingegen konnte niemals detektiert werden, was die Vermutung laut werden lässt, dass ein Zusammenspiel von CRLR sowie RAMP 1 und/oder RAMP 2 eine Bindung von IMD und AM bewirkt.

### **4.3 Regulation der Expression von Adrenomedullin und Intermedin unter Hypoxie**

Bereits 2009 konnten Pfeil et al. zeigen, dass Sauerstoffmangel im Lungengewebe eine vermehrte Ausschüttung der beiden Peptide der Calcitoninpeptidfamilie nach sich zieht (*Pfeil et al. 2009*). Angesichts dieser Tatsache, soll erstmalig auch in Zellen des Bohrmehls untersucht werden, ob es durch Hypoxie zur Erhöhung der mRNA von AM und IMD kommt. Zu diesem Nachweis diente die real-time PCR.

#### **4.3.1 Adrenomedullin**

Zur Untersuchung der Fragestellung wurden multipotente Stromazellen des Bohrmehls mittels real-time PCR auf ihren Gehalt an mRNA von AM untersucht.

Dabei war festzustellen, dass es durch einen achtstündigen Sauerstoffmangel in den Zellen zu einer signifikanten Hochregulation des AM kommt.

Außerdem vermuteten Nagaya et al., dass Sauerstoffmangel eine vermehrte Ausschüttung von AM bewirkt und die Angiogeneserate erhöht wird. Bereits Cornish stellte die Vermutung auf, dass es durch den Einfluss von AM zu einer vermehrten Gefäßeinsprossung im Knochen kommt (*Cornish et al. 2001*). Diese Aussagen decken sich mit den Ergebnissen dieser Arbeit und lassen schlussfolgern, dass bei Kortikalisunterbrechung des Knochens, zum Beispiel im Zuge einer Fraktur, vermehrt AM ausgeschüttet und gebildet wird. Durch diesen Reiz werden vaskuläre Neubildungen verursacht. Damit würde AM im Fall von Knochendefekten nicht nur durch Osteoblastenstimulation den Knochen zur Regeneration anregen, sondern auch durch die Gefäßeinsprossung. In diesem Zusammenhang kommt es somit zu einer optimalen Versorgung des Defektes mit Sauerstoff und einer schnellen Versorgung des Gewebes mit Nährstoffen.

#### **4.3.2 Intermedin**

Auch zur Untersuchung des IMD wurden humane multipotente Stromazellen in der real-time PCR verwendet. Aus den Ergebnissen lässt sich schlussfolgern, dass

Sauerstoffmangel eine verminderte Bildung von IMD-mRNA nach sich zog. Hierbei ist die Frage zu klären, warum sich IMD gegensätzlich zum AM verhält, da die große Ähnlichkeit beider Peptide ein gleichgesinntes Verhalten vermuten lassen würde. Außerdem grenzen sich die Ergebnisse von den Resultaten anderer Studien ab. So zeigte beispielsweise die Arbeitsgruppe um Pfeil, dass Hypoxie eine signifikante Hochregulation des IMD in pulmonalen Endothelzellen hervorruft und somit die Barrierefunktion der Lunge stärkt. Ähnliche Nachweise gelangen Pfeil et al. für Herzmuskelzellen, neuronale Zellen und Fibroblasten.

In osteoblastären Zellen wurde der Einfluss von Hypoxie auf die Expression von IMD bis zum jetzigen Zeitpunkt noch nicht untersucht. Eine mögliche Ursache dafür, dass keine Hochregulation des IMD unter Hypoxie erfolgte, könnte die Tatsache sein, dass es aufgrund der stattgehabten Fraktur und der nachfolgenden Sauerstoffmangelversorgung zur Ausschüttung sogenannter Antioxidantien kommt (*Bell et al. 2007*). Diese, auch als Radikalfänger bezeichnete Substanzklasse, könnte die Produktion von IMD hemmen. So zeigten bereits Bell et al., dass es unter oxidativem Stress mit Hilfe dieser Antioxidantien zu keinerlei Erhöhung des IMD-Spiegels in Kardiomyozyten kommt. Einer Erhöhung von AM konnte hingegen ebenfalls nicht entgegengewirkt werden, was sich mit den Aussagen dieser Arbeit decken würde (*Bell et al. 2007*).

Des Weiteren ist vorstellbar, dass AM und IMD zu unterschiedlichen Zeitpunkten in die Entstehung neuer Gefäße eingreifen. So unterscheidet man bei diesem Vorgang eine Angiogenese von einer Vaskulogenese. Bei Erstem werden neue Blutgefäße aus bereits vorhandenen Gefäßzellen durch Aussprossen gebildet (*Adams et al. 2007*). Die Vaskulogenese hingegen beinhaltet die komplette Neuentstehung des Gefäßsystems aus endothelialen Vorläuferzellen. Nun wäre zu vermuten, dass es nur zur Neuaussprossung kommt, da im Zuge der Fraktur lediglich eine Unterbrechung bereits vorhandener Kapillaren erfolgt. In diesem Zusammenhang wäre es möglich, dass nun AM in die Angiogenese eingreift und somit nach einer Fraktur ausgeschüttet wird. IMD hingegen sorgt für die Vaskulogenese und wird zu diesem Zeitpunkt nicht benötigt. Somit könnte es auch sein, dass der Gewebewachstumsfaktor VEGF lediglich AM stimuliert, IMD hingegen nicht beeinflusst.

Ein weiterer vorstellbarer Punkt könnte sein, dass IMD eine höhere Affinität zum CRLR besitzt. Somit wäre es möglich, dass es direkt nach Unterbrechung der

Sauerstoffzufuhr zu einer Ausschüttung des IMD kommt, AM hingegen wird verzögert ausgeschüttet. Somit wird IMD bereits über den Rezeptor umgesetzt bzw. abgebaut und ist in den Untersuchungen zum gemessenen Zeitpunkt nicht mehr nachweisbar.

Die Tatsache, dass AM rein über Stimulation der Osteoblasten auf das Knochenwachstum wirkt, könnte ebenfalls eine Erklärung für diese Beobachtungen sein. Denn so entwickeln sich Osteoblasten aus den mesenchymalen Stammzellen, Osteoklasten hingegen aus den hämatopoetischen Stammzellen. So wäre vorstellbar, dass es nach einer Fraktur in erster Linie zur Osteoblastenstimulation durch AM kommt. IMD, was hingegen vermutlich vorwiegend über Hemmung der Osteoklasten seine Wirkung entfaltet, wird zu einem späteren Zeitpunkt benötigt und spielt hier bei der Untersuchung der kultivierten Zellen aus dem mesenchymalem System keine Rolle. Interessant wäre es nun, weitere Untersuchungen an Osteoklasten bezüglich der Wirkungsweise des IMD folgen zu lassen.

Diese Überlegungen stellen allerdings lediglich Ansätze und Spekulationen dar und bedürfen einer genaueren Untersuchung der Wirkung von IMD im Zusammenhang mit Knochenwachstum, Frakturen sowie Knochenbildungsstörungen.

#### 4.4 Osteosarkomzellen und Bohrmehl

Osteosarkomzellen stellen ein ideales Material zur experimentellen Forschung dar, da sie einem schnellen Wachstum unterliegen und eine anspruchslose Kultivierung erfordern. Mit 21,6 Stunden Verdopplungszeit proliferiert sich die Zelllinie TE 85 unter den Osteosarkomzellen am schnellsten.

Da sie den Osteoblasten am ähnlichsten ist, eignet sie sich ideal um ein Knochenwachstum zu imitieren.

Das Bohrmehl stellt mit seinem enormen Differenzierungspotential die zweite Möglichkeit dar, die Fragestellung zu beantworten. Wie schon in früheren Studien gezeigt wurde, sind die im Bohrmehl enthaltenen MSC zu einer adipogenen, chondrogenen, osteogenen und neurogenen Ausreifung in der Lage (*Colter et al. 2001, Trinkaus et al. 2005*). Mit Hilfe der Primer für OPN (Nachweismarker für Knochenzellen), Agg (Nachweismarker für Knorpelzellen) und PPAR $\gamma$  (Nachweismarker für Fettzellen) und CD90 konnte der Beweis für die Differenzierung erfolgen. Das Vorhandensein von Zellmaterial in den untersuchten Proben wurde mit  $\beta$ MG belegt. Somit hatten stromale Zellen den Bohrvorgang und die weitere Aufbereitung des Zellmaterials überlebt, wie auch schon von Trinkaus et al. und Colter et al. beschrieben wurde. Mit seiner ausgeprägten Differenzierungsbereitschaft und der Tatsache, dass das Bohrmehl kostengünstig und einfach zugänglich ist, stellt es nicht nur ein lukratives Material zur experimentellen Forschung dar, sondern auch eine zukunftsorientierte Methode in der Behandlung von Knochendefekten. Somit können gewonnene körpereigene Zellen dem Körper eines Patienten nach Aufbereitung im Rahmen des „Tissue-Engineering“ wieder zugeführt und ein Gewebedefekt damit geheilt werden.

## 4.5 Die Rolle der Calcitoninpeptidfamilie im Knochenstoffwechsel

Zu der Calcitoninpeptidfamilie werden derzeit die fünf Mitglieder - Calcitonin, Amylin, CGRP, AM und IMD - gezählt, weil sie alle biologische und strukturelle Gemeinsamkeiten aufweisen.

Als erstes Peptid dieser Gruppe wurde 1960 das Calcitonin entdeckt. Es reguliert die Knochenbildung nicht direkt über die Osteoblasten und Osteoklasten, sondern greift in den Knochenstoffwechsel über die Regulation des Calciumspiegels ein (siehe Kapitel 1.1.1). Durch die jahrelange Erforschung und seine osteoprotektive Wirkung wird das Calcitonin bereits mit nachweislichem Erfolg bei Knochendefekten wie Morbus Paget oder Osteoporose eingesetzt (*Copp et al. 2004*).

Beim CGRP konnte in der Vergangenheit belegt werden, dass es über Osteoblastenaktivierung und Osteoklastenhemmung aktiv in die Regulation der Knochenformation eingreift (*Burns et al. 2004*) (siehe Kapitel 1.1.2). Auch CGRP wirkt, wie das Calcitonin, als Modulator des Calciumspiegels (*Togari et al. 1997*).

Das ursprünglich im Pankreas entdeckte Amylin kann das Knochenwachstum durch Hemmung der Osteoklastenmobilität und Förderung der Osteoblastenproliferation anregen (*Alam et al. 1993, Cornish et al. 1998*) (siehe Kapitel 1.1.3).

Für AM wurde nachgewiesen, dass es nicht, wie die drei bereits bekannten Peptide, die Knochenresorption hemmt, sondern rein über Stimulation der Osteoblasten fungiert (*Lerner 2006*). Außerdem zeigte Cornish, dass nach lokaler Stimulation des Knochens mit AM dieser deutlich härter und dichter war (*Cornish et al. 2001*). So zeigten sich in den Ergebnissen von Cornish et al., dass die Kortikalis eines Mäuseknochens nach lokaler Verabreichung von AM über vier Wochen um 21% an Breite zugenommen hatte. Außerdem erhöhte sich das Volumen des Trabekelwerkes in diesem Knochen um 45%. Cornish et al. beobachteten dabei eine erhöhte Aktivität der Osteoblasten, die Messwerte für die Osteoklasten änderten sich allerdings nicht.

Das AM ist auf alle Fälle, gleich den anderen drei Polypeptiden der Calcitoninpeptidfamilie, als ein anaboler Faktor im Knochenstoffwechsel anzusehen und regt durch sein lokales Auftreten das Knochenwachstum an.

Erstmalig gelang mit den vorliegenden Untersuchungen auch der Nachweis von mRNA des IMD in humanem Knochenmaterial. Dieses Ergebnis lässt

schlussfolgern, dass auch IMD ein Peptid der lokalen Regulation des Knochenaufbaus darstellt und ähnlich dem AM in dieses System modulierend eingreift.

Mit meinen Ergebnissen zeigte ich das Vorhandensein von AM und IMD in humanem Knochenmaterial sowie Osteoblastenkulturen und charakterisierte die Expression der Rezeptoren dieser Peptide in den entsprechenden Zellen. Hinsichtlich dieser Schlussfolgerungen lässt sich vermuten, dass nicht nur die bekannten Mitglieder der Familie, das Calcitonin, CGRP und Amylin, sondern auch AM und das neue IMD eine große Rolle in der lokalen Regulation des Knochenmetabolismus spielen.

Außerdem zeigte sich, dass AM nicht nur durch anabole Wirkung auf das Knochenmaterial eine Heilung von Defekten fördert, sondern dass es auch zu einer vermehrten Gefäßeinsprossung in solch hypoxischen Gebieten führt. Somit unterstützt es den Knochenaufbau auch durch Nährstoffversorgung und Zufuhr von Sauerstoff.

Möglicherweise wurden mit diesen Ergebnissen neue Perspektiven in der Behandlung von Knochendefekten geschaffen.

## 4.6 Ausblick

Die Coexpression von AM, IMD und ihren Rezeptorkomponenten in Osteosarkomzellen sowie differenzierten und undifferenzierten Bohrmehlzellen erlaubt die Feststellung, dass diese Peptide eine zentrale Rolle im Umbau von Knochenmaterial spielen und lokal-regulatorisch in dieses Geschehen eingreifen.

Zu klären bleibt, auf welchem genauen Weg IMD in dieses System hineinspielt. Bei AM scheint bewiesen, dass es rein über die Osteoblastenstimulation wirkt und keinen Einfluss auf die Knochenresorption übt. Außerdem verübt AM vasoregulatorische Einflüsse im Knochen und bedingt dadurch eine schnelle Knochenheilung durch das Einsprossen von Gefäßen. Die Rolle von IMD im Knochenstoffwechsel ist allerdings noch nicht klar definiert. So bleibt vorerst zu klären, inwieweit es den Knochenaufbau stimuliert. Eine zentrale Frage stellt außerdem dar, weshalb IMD unter Sauerstoffmangel im Knochengewebe herunterreguliert wird. Mögliche Erklärungen werden bereits in dieser Arbeit angerissen.

Da der Nachweis für AM, IMD und ihre Rezeptoren auch im adipogen differenzierten Bohrmehl erfolgte, bleibt weiterhin zu klären, wie die Peptide auf das Fettgewebe wirken. Kommt es auch hier zur Wachstumsstimulation oder erfolgt eine Gefäßneubildung? Ein Ansatz besagt, dass AM eher katabole Wirkung im Fettstoffwechsel besitzt. Auch zu dieser Vermutung sollten weitere Beweise erbracht werden, um die genau Position des AM und des im Fettgewebe noch gänzlich unerforschten IMD zu definieren.

RAMP 3 konnte in den untersuchten Zellkulturen nicht nachgewiesen werden. Hier bleibt die Frage ungeklärt, wie die Calcitoninpeptidfamilie in dieser Zellart ihre Wirkung verbreitet.

Außerdem herrscht noch allgemeine Uneinigkeit über die Selektivität der Mitglieder der Calcitoninpeptidfamilie zu den Rezeptoren im Zusammenspiel mit den RAMPs. Auch hier wäre es grundlegend wichtig, intensivere Untersuchungen folgen zu lassen.

Diese weiteren Forschungsansätze ermöglichen es vielleicht bald, die eindeutigen Aufgaben von IMD und AM im Knochen, Knorpel sowie Fettgewebe zu definieren und zu klären, welche Wirkungsmechanismen diese Mitglieder der



Calcitoninpeptidfamilie besitzen. Haben sich diese Fragen erschlossen, so eröffnen sich möglicherweise völlig neue therapeutische Ansätze in der Behandlung von Knorpelverschleiß, Knochendefekten und Adipositas.

## 5 Zusammenfassung

Knochengewebe ist im menschlichen Organismus unersetzlich und dient neben der Speicherung von wichtigen Mineralien und Nährstoffen wie Calcium, Natrium sowie Magnesium auch als Stütz- und Schutzapparat innerer Organe.

Die Calcitoninpeptidfamilie ist wesentlich am Aufbau des Knochens beteiligt und übt sowohl osteoproliferative als auch osteoresorptive Aufgaben aus.

Die vorliegende Arbeit befasst sich erstmalig mit dem Vorhandensein von Intermedin und Adrenomedullin - zwei Mitglieder dieser Peptidfamilie - in differenzierten und undifferenzierten humanen Bohrmehlzellen und humanen Osteosarkomzellen.

Vor dem Hintergrund der Sauerstoffversorgung im Frakturbereich, wurde zum ersten Mal der Frage nachgegangen, ob die Expression von Adrenomedullin und Intermedin in multipotenten Stromazellen unter Hypoxie beeinflusst wird.

Mit Hilfe der RT-PCR konnten Intermedin, Adrenomedullin und ihre Rezeptorkomponenten in undifferenzierten sowie adipogen, chondrogen und osteogen differenzierten Bohrmehlzellen, gleichermaßen wie in der Osteosarkomzelllinie TE 85, nachgewiesen werden. Ein Nachweis von RAMP 3 konnte nicht erfolgen. In den Versuchen der real-time PCR wurde des Weiteren gezeigt, dass es unter Hypoxie zu einer Steigerung der Expression von Adrenomedullin in multipotenten Stromazellen kommt. Intermedin hingegen wurde in den Versuchen herunterreguliert.

CGRP, Adrenomedullin und Intermedin wurden in der Vergangenheit bereits in osteogenem Material von Nagetieren detektiert. Alle drei Proteine entfalten ihre Wirkung über den Calcitonin-Rezeptor-like-Rezeptor (CRLR) im Zusammenspiel mit den Receptor-activity-modifying-Proteins (RAMPs).

Außerdem wurde bereits dargelegt, dass es zu einer Hochregulation von Adrenomedullin und Intermedin im hypoxischen Lungengewebe kommt. Adrenomedullin wird bei Sauerstoffmangel vermehrt gebildet und stellt damit einen Stimulus zur Knochendefektheilung durch Neovaskularisation dar.

So könnte es auch nach einer Fraktur und der daraus resultierenden Unterbrechung der Blutzufuhr des Gewebes, zu einer vermehrten Ausschüttung dieses Proteins

kommen, da die Sauerstoffspannung herabgesetzt wird und eine lokale Hypoxie herrscht.

Intermedin hingegen wird unter Sauerstoffmangel herunterreguliert und es stellt sich somit die Frage, wie dieses Peptid genau in den Knochenstoffwechsel eingreift.

Eins scheint allerdings sicher: Auch Intermedin und Adrenomedullin sind durch ihre osteoproliferativen als auch osteoresorptiven Eigenschaften im Wesentlichen am Knochenumbau beteiligt.

Mit Hilfe dieser Erkenntnisse könnten die beiden Peptide eine bedeutende Therapiemöglichkeit in der Behandlung der Volkskrankheit Osteoporose, dem Morbus Paget sowie anderer Stoffwechselstörungen des Knochengewebes darstellen und neue Zukunftsperspektiven eröffnen.

## 6 Summary

Bone tissue is irrecoverable in human organism and serves as storage of important minerals and nutrients like calcium, natrium and magnesium, as well as brace and protection of vital parts.

The calcitonin-peptide-family is important for bone structure and works both osteoproliferative as well as osteoresorptive.

This paper deals with the existence of intermedin and adrenomedullin – two parts of this peptide family - in differentiated and undifferentiated human reaming debris, as well as in osteosarcoma cells. An issue that has never been investigated before.

In addition, the question is addressed of whether hypoxia might have an effect on the expression of adrenomedullin and intermedin in multipotent stroma cells.

By means of RT-PCR intermedin, adrenomedullin and their receptor components were detected in undifferentiated and adipogenic, chondrogenic and osteogenic differentiated reaming debris as well as in the osteosarcoma cell line TE 85. Whereas RAMP 3 was not detected. Using RT-PCR, we showed, that hypoxia leads to an increasing expression of adrenomedullin in multipotent stroma cells. In contrast, intermedin is downregulated under hypoxia.

CGRP, adrenomedullin and intermedin, parts of this family, were detected in osteogenic material of rodents. Those three proteins develop their effect via calcitonin-receptor-like-receptor (CRLR) in interaction with receptor-activity-modifying-proteins (RAMPs).

In addition, the upregulation of adrenomedullin and intermedin in lung tissue was shown.

Consequently, after a fracture and the resulting discontinuance of blood supply of the tissue, there might be a distribution of this protein, because the oxygen pressure is reduced and local hypoxia exists. Since adrenomedullin is expressed during the lack of oxygen it serves as a stimulus of bone healing via neovascularisation.

On the contrary, intermedin is downregulated under hypoxia. Therefore the question arises, how this peptide exactly influences bone metabolism.

One fact is fore sure: intermedin and adrenomedullin are also involved in bone metabolism, due to their osteoproliferative and osteoresorptive character.

By means of these results, both peptids could be a considerable possibility in therapy of the widespread diseases osteoporosis, morbus paget and other metabolism disorders of bone tissue and open up new vistas.

## 7 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: <i>Primärstruktur eines humanen Calcitoninmoleküls.</i>	3
Abbildung 2: <i>Primärstruktur eines humanen Adrenomedullinmoleküls.</i>	8
Abbildung 3: <i>Primärstruktur eines humanen Intermedinmoleküls.</i>	10
Abbildung 4: <i>Modell eines G-Protein-gekoppelten-Rezeptors.</i>	12
Abbildung 5: <i>Knochenfragment im Bohrmehl mit auswachsenden Zellen.</i>	19
Abbildung 6: <i>RS1-Zelle im Bohrmaterial.</i>	20
Abbildung 7: <i>RS2-Zelle im Bohrmaterial.</i>	20
Abbildung 8: <i>Reife, mesenchymale Stammzelle im Bohrmaterial.</i>	21
Abbildung 9: <i>Osteosarkomzelllinie TE 85.</i>	25
Abbildung 10: <i>Zelllinie ZK 21 undifferenziert.</i>	26
Abbildung 11: <i>Zelllinie ZK 18 adipogen differenziert.</i>	28
Abbildung 12: <i>Zelllinie ZK 20 adipogen differenziert, Oil-Red-O-Färbung.</i>	28
Abbildung 13: <i>Aus einem Knochenfragment des Bohrmehls auswachsende undifferenzierte Zellen.</i>	29
Abbildung 14: <i>Zelllinie ZK 17 osteogen differenziert.</i>	30
Abbildung 15: <i>Zelllinie ZK 20 chondrogen differenziert.</i>	31
Abbildung 16: <i>Petrischalen unter Hypoxie.</i>	32
Abbildung 17: <i>Agarosegel der RT-PCR zum Nachweis von AM, IMD, CRLR und RAMP 1-3 in der Osteosarkomzelllinie TE 85.</i>	57
Abbildung 18: <i>Agarosegel der RT-PCR zum Nachweis von AM, IMD, CRLR und RAMP 1-3 in undifferenzierten multipotenten Stromazellen.</i>	57
Abbildung 19: <i>Agarosegel der RT-PCR zum Nachweis von AM, IMD, CRLR und RAMP 1-3 in adipogen differenzierten Stromazellen.</i>	58
Abbildung 20: <i>Agarosegel der RT-PCR zum Nachweis von AM, IMD, CRLR und RAMP 1-3 in chondrogen differenzierten Stromazellen.</i>	58
Abbildung 21: <i>Agarosegel zum Nachweis von AM, IMD, CRLR und RAMP 1-3 in osteogen differenzierten Stromazellen.</i>	59
Abbildung 22: <i>Boxplot der dCT-Werte von AM.</i>	63

Abbildung 23: <i>Boxplot der dCT-Werte von IMD.</i> .....	65
---	----

## 8 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: <i>Darstellung der Rezeptoren mit ihren einzelnen Rezeptorkomponenten und deren Liganden. ....</i>	16
Tabelle 2: <i>Primersequenzen der verwendeten Primer mit den dazugehörigen Produktlängen, den Temperaturen und entsprechenden Nummern der Gendatenbank. ....</i>	37
Tabelle 3: <i>Primersequenzen der verwendeten Primer mit den dazugehörigen Produktlängen, den Temperaturen und entsprechenden Nummern der Gendatenbank. ....</i>	42
Tabelle 4: <i>Zusammenfassung der Ergebnisse von IMD, AM, RAMP 1-3 und CRLR für den Nachweis in der Osteosarkomzelllinie TE 85 und den multipotenten Stromazellen. ....</i>	56
Tabelle 5: <i>Ermittelte dCT-Werte für AM. ....</i>	61
Tabelle 6: <i>Ermittelte dCT-Werte für IMD. ....</i>	64



## 9 Abkürzungsverzeichnis

Agg	Aggrecan
AM	Adrenomedullin
AS	Aminosäuren
AMY	Amylin
βMG	beta-Mikroglobulin
BMI	Body-Mass-Index
cAMP	cyklisches Adenosin-Monophosphat
CD90	cluster of differentiation 90
CGRP	Calcitonin-Gene-Related-Peptide
COS	color odor sapor, Fibroblastenzelllinie
cm <sup>2</sup>	Quadratzentimeter
CR	Calcitonin-Receptor
CRLR	Calcitonin-Receptor-Like-Receptor
CRSP	Calcitonin-Receptor-Stimulating-Protein
CT	Calcitonin
CT-Wert	Cycle-Treshold-Wert
°C	Grad Celsius
dATP	Desoxyadenosintriphosphat
dCT	delta-Cycle-Treshold
dCTP	Desoxycytosintriphosphat
DEPC	Diethylpyrocarbonat
dGTP	Desoxyguanintriphosphat
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
dNTP	Desoxyribonucleotide triphosphate
DTT	Dithiothreitol
dTTP	Desoxytyrosintriphosphat
EDTA	Ethylendiamin-tetraacetacid
FKS	Fetales Kälberserum
g	Zentrifugalkraft; Gramm
HCl	Chlorwasserstoff
HOS	humane Osteosarkomzellen (entspricht TE 85)
IL-1	Interleukin 1
IMD	Intermedin
ITS	Insulin-Transferrin-Selenite-Lösung
M	Mol
μg	Mikrogramm
μl	Mikroliter

µm	Mikrometer
µM	Mikromol
mM	Millimol
mRNA	messenger Ribonukleinsäure, messenger ribonuclein acid
MSC	multipotente Stromazellen
n	Anzahl
nm	Nanometer
OPN	Osteopontin
p	Irrtumswahrscheinlichkeit
PCR	Polymerase-Kettenreaktion, polymerase chain reaction
PBS	phosphate buffered saline
pmol	Pikomol
PPARγ	Peroxisome proliferator-activated receptor gamma
RA	Rheumatoide Arthritis
RAMP	Rezeptor-Activity-Modifying-Protein
RCP	Rezeptor-Component-Protein
RLT	Lysispuffer von QIAGEN, Bestandteil des RNeasy Kits
RNA	Ribonukleinsäure, ribonuclein acid
RPE	Waschpuffer von QIAGEN, Bestandteil des RNeasy Kits
rpm	Umdrehung pro Minute, revolutions per minute
RS	rapidly self renewing cell
RT	Reverse-Transkriptase
RT-PCR	Reverse-Transkriptase Polymerase-Kettenreaktion, reverse-transcriptase polymerase chain reaction
RW1	Waschpuffer von QIAGEN, Bestandteil des RNeasy Kits
TAE	Tris-Acetat-EDTA-Puffer
TGF-β	transforming growth factor beta
TNF-α	Tumornekrosefaktor alpha
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
U	Einheit, unit
V	Volt
VEGF	Gewebewachstumsfaktor, vascular-endothelial-growth-factor
ZK	Zelllinie der Bohrmehlzellkulturen
ZNS	Zentralnervensystem

## 10 Literaturverzeichnis

- Adams RH, Alitalo K (2007) Molecular regulation of angiogenesis and lymphangiogenesis. *Nat Rev Mol Cell Biol* 8(6): 464-478
- Adeghate E, Kalász H (2011) Amylin analogues in the treatment of diabetes mellitus: medicinal chemistry and structural basis of its function. *Open Med Chem J* 5(2): 78-81
- Ajai S, Abbass AM, Rajeshwer NS, Nar SV (2012) Immunoregulation of bone remodeling. *Int J Crit Illn Inj Sci* 2(2): 75–81
- Alam AS, Moonga BS, Bevis PJ, Huang CL, Zaidi M (1993) Amylin inhibits bone resorption by a direct effect on the motility of rat osteoclasts. *Exp Physiol* 78(2): 183-196
- Amara AG, Jonas V, Rosenfeld MG, Ong ES, Evans RM (1982) Alternative RNA processing in calcitonin gene expression generates mRNAs encoding different polypeptide products. *Nature* 298(5871): 240-244
- Arnett TR, Gibbson DC, Utting JC, Orriss IR, Hoebertz A, Rosendaal M, Meghji S (2003) Hypoxia is a major stimulator of osteoclast formation and bone resorption. *J Cell Physiol* 196(1): 2-8
- Arulmani U, Maassenvandenbrink A, Villalón CM, Saxena PR (2004) Calcitonin gene-related peptide and its role in migraine pathophysiology. *Eur J Pharmacol* 500(1-3): 315-330
- Bailey RJ, Bradley JW, Poyner DR, Rathbone DL, Hay DL (2009) Functional characterization of two human receptor activity-modifying protein 3 variants. *Peptides* 31(4): 579-584
- Bell D, Zhao Y, McCoy FP, Devine AB, McDermott BJ (2007) Differential effects of an anti-oxidant intervention on cardiomyocyte expression of adrenomedullin and intermedin and their receptor components in chronic nitric oxide deficiency. *Cell Physiol Biochem* 20(5): 269-282
- Bjurholm A (1991) Neuroendocrine peptides in the bone. *Int Orthop* 15(4): 325-329
- Bjurholm A, Kreicbergs A, Schultzberg M, Lerner UH (1992) Neuroendocrine regulation of cyclic AMP formation in osteoblastic cell lines (UMR-106-01, ROS 17/2.8, MC3T3-E1, and Saos-2) and primary bone cells. *J Bone Miner Res* 7(9): 1011-1019

- Blakely P, Vaughn DA, Fanestil DD (1997) Amylin, calcitonin gene-related peptide, and adrenomedullin: effects on thiazide receptor and calcium. *Am J Physiol* 272(3 Pt 2): 410-415
- Bühlmann N, Leuthäuser K, Muff R, Fischer JA, Born W (1999) A receptor activity modifying protein (RAMP)2- dependent adrenomedullin receptor is a calcitonin gene-related peptide receptor when coexpressed with human RAMP1. *Endocrinology* 140(6): 2883-2890
- Burak Kandilci H, Gumusel B, Wasserman A, Witriol N, Lippman H (2006) Intermedin/ Adrenomedullin-2 dilates the rat pulmonary vascular bed: Dependence of CGRP receptors and nitric oxide release. *Peptides* 27(6): 1390-1396
- Burns DM, Stehno-Bittel L, Kawase T (2004) Calcitonin gene-related peptide elevates calcium and polarizes membrane potential in MG-63 by both cAMP-independent and -dependent mechanisms. *Am J Physiol Cell Physiol* 287(2): C457-467
- Bronský J, Průša R, Nevoral J (2006) The role of amylin and related peptides in osteoporosis. *Clin Chim Acta* 373(1-2): 9-16
- Caron KM, Smithies O (2001) Extreme hydrops fetalis and cardiovascular abnormalities in mice lacking a functional adrenomedullin gene. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98(2): 615-619
- Chambers TJ, Magnus CJ (1982) Calcitonin alters behavior of isolated osteoclasts. *J Pathol* 136(1): 27-39
- Chang CL, Roh J, Hsu SY (2004) Intermedin, a novel calcitonin family peptide that exists in teleosts as well as in mammals: A comparison with other calcitonin/ intermedin family peptides in vertebrates. *Peptides* 25(10): 1633-1642
- Chesnut CH, Silverman S, Adriano K, Genant H, Gimona A, Harris S, Kiel D, LeBoff M, Maricic M, Miller P, Moniz C, Peacock M, Richardson P, Watts N, Baylink D (2000) A randomized trial of nasal spray salmon calcitonin in postmenopausal women with established osteoporosis: the prevent recurrence of osteoporotic fractures study. PROOF Study Group. *Am J Med* 109(4): 267-276
- Chosa E, Hamada H, Kitamura K, Kuwasako K, Yanagita T, Eto T, Tajima N (2003) Expression of adrenomedullin and its receptor by chondrocyte phenotype cells. *Biochem Biophys Res Commun* 303(1): 379-386
- Clark JR, Fridman TR, Odell MJ, Brierley J, Walfish PG, Freeman JL (2005) Prognostic variables and calcitonin in medullary thyroid cancer. *Laryngoscope* 115(8): 1445-1450
- Clover J, Gowen M (1994) Are MG-63 and HOS TE 85 human osteosarcoma cell lines representative models of the osteoblastic phenotype? *Bone* 15(6): 585-591

- Colter DC, Sekiya I, Prockop DJ (2001) Identification of a subpopulation of rapidly self-renewing and multipotential adult stem cells in colonies of human marrow stromal cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98(14): 7841-7845
- Cooper GJ, Leighton B, Dimitriadis GD, Parry-Billings M, Kowalchuk JM, Howland K, Rothbard JB, Willis AC, Reid KB (1988) Amylin found in amyloid deposits in human type 2 diabetes mellitus may be a hormone that regulates glycogen metabolism in skeletal muscle. *Proc Natl Acad Sci U S A* 85(20): 7763-7766
- Copp DH (1994) Calcitonin: discovery, development, and clinical application. *Clin Invest Med* 17(3): 268-277
- Cornish J, Callon KE, Bava U, Coy DH, Mulvey TB, Murray MA, Cooper GJ, Reid IR (2001) Systemic administration of adrenomedullin (27-52) increases bone volume and strength in the male mice. *J Endocrinol* 170(1): 251-257
- Cornish J, Callon KE, Bava U, Kamona SA, Cooper GJ, Reid IR (2001) Effects of calcitonin, amylin and calcitonin gene-related peptide on osteoclast development. *Bone* 29(2): 162-168
- Cornish J, Callon KE, Cooper GJ, Reid IR (1995) Amylin stimulates osteoblast proliferation and increases mineralized bone volume in adult mice. *Biochem Biophys Res Commun* 207(1): 133-139
- Cornish J, Callon KE, Coy DH, Jiang NJ, Xiao L, Cooper GJ, Reid IR (1997) Adrenomedullin is a potent stimulator of osteoblastic activity in vitro and in vivo. *Am J Physiol* 273(6 Pt 1): E1113-1120
- Cornish J, Callon KE, Lin CQ, Xiao CL, Gamble GD, Cooper GJ, Reid IR (1999) Comparison of the effects of calcitonin gene-related peptide and amylin on osteoblasts. *J Bone Miner Res* 14(8): 1302-1309
- Cornish J, Callon KE, Lin CQ, Xiao CL, Mulvey TB, Coy DH, Cooper GJ, Reid IR (1998) Dissociation of the effects of amylin on osteoblast proliferation and bone resorption. *Am J Physiol* 274(5 Pt 1): E827-833
- Cornish J, Naot D (2002) Amylin and adrenomedullin: New regulators of bone growth. *Curr Pharm Des* 8(23): 2009-2021
- Cornish J, Reid IR (2001) Effects of amylin and adrenomedullin on the skeleton. *J Musculoskelet Neuronal Interact* 2(1): 15-24
- Dacquin R, Davey RA, Laplace C, Levasseur R, Morris HA, Goldring SR, Gebre-Medhin S, Galson DL, Zajac JD, Karsenty G (2004) Amylin inhibits bone resorption while the calcitonin receptor controls bone formation in vivo. *J Cell Biol* 164(4): 509-514

- Dai X, Ma W, Jha RK, He X (2010) Adrenomedullin and its expression in cancers and bone. A literature review. *Front Biosci (Elite Ed)* 1;2: 1073-1080
- Derst C, Engel H, Grzeschik KH, Daut J (2000) Genomic structure and chromosome mapping of human and mouse RAMP genes. *Cytogenet Cell Genet* 90(1-2): 115-118
- Ding YQ, Zhu LJ, Bagchi MK, Bagchi IC (1994) Progesterone stimulates calcitonin gene expression in the uterus during implantation. *Endocrinology* 135(5): 2265-2274
- Drissi H, Hott M, Marie PJ, Lasmoles F (1997) Expression of the CT/CGRP gene and its regulation by dibutyryl cyclic adenosine monophosphate in human osteoblastic cells. *J Bone Miner Res* 12(11): 1805-1814
- Dumont Y, Chabot JG, Quirion R (2004) Receptor autoradiography as mean to explore the possible functional relevance of neuropeptides: focus on new agonists and antagonists to study natriuretic peptides, neuropeptide Y and calcitonin gene-related peptides. *Peptides* 25(3): 365-391
- Ellegaard M, Thorkildsen C, Petersen S, Petersen JS, Jørgensen NR, Just R, Schwarz P, Ramirez MT, Stahlhut M (2010) Amylin (1-8) is devoid in anabolic activity in bone. *Calcif Tissue Int* 86(3): 249-260
- Eto T, Kitamura K (2001) Adrenomedullin and its role in renal diseases. *Nephron* 89(2): 121-134
- Evans BN, Rosenblatt MI, Mnayer LO, Oliver KR, Dickerson IM (2000) CGRP-RCP, a novel protein required for signal transduction at calcitonin gene-related peptide and adrenomedullin receptors. *J Biol Chem* 275(40): 31438-31443
- Foord SM, Marshall FH (1999) RAMPs: accessory proteins for seven transmembrane domain receptors. *Trends Pharmacol Sci* 20(5): 184-187
- Fraioli F, Fabbri A, Gnessi L, Silvestroni L, Moretti C, Redi F, Isidori A (1984) Beta-endorphin, met-enkephalin, and calcitonin in human semen: Evidence for a possible role in human sperm motility. *Ann N Y Acad Sci* 438: 365-370
- Fujisawa Y, Nagai Y, Miyatake A, Takei Y, Miura K, Shoukouji T, Nishiyama A, Kimura S, Abe Y (2004) Renal effects of a new member of adrenomedullin family, adrenomedullin2, in rats. *Eur J Pharmacol* 497(1): 75-80
- Fukai N, Yoshimoto T, Sugiyama T, Ozawa N, Sato R, Shichiri M, Hirata Y (2004) Concomitant expression of adrenomedullin and its receptor components in rat adipose tissues. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 288: 56-62
- Gebre-Medhin S, Mulder H, Pekny M, Westermark G, Törnell J, Westermark P, Sundler F, Ahrén B, Betsholtz C (1998) Increased insulin secretion and glucose tolerance in mice lacking islet amyloid polypeptide (amylin). *Biochem Biophys Res Commun* 250(2): 271-277

- Gorn AH, Lin HY, Yamin M, Auron PE, Flannery MR, Tapp DR, Manning CA, Lodish HF, Krane SM, Goldring SR (1992) Cloning, characterization, and expression of a human calcitonin receptor from an ovarian carcinoma cell line. *J Clin Invest* 90(5): 1726-1735
- Granholm S, Henning P, Lerner UH (2011) Comparisons between the effects of calcitonin receptor-stimulating peptide and intermedin and other peptides in the calcitonin family on bone resorption and osteoclastogenesis. *J Cell Biochem* 112: 3300-3312
- Granholm S, Lundberg P, Lerner UH (2008) Expression of the calcitonin receptor, calcitonin receptor-like receptor, and receptor activity modifying proteins during osteoclast differentiation. *J Cell Biochem* 104(3): 920-933
- Gupta P, Harte AL, da Silva NF, Khan H, Barnett AH, Kumar S, Sturdee DW, McTernan PG (2007) Expression of the calcitonin gene-related peptide, adrenomedullin, and receptor modifying proteins in human adipose tissue and alteration in their expression with menopause status. *Menopause* 14(6): 1031-1038
- Harmancey R, Senard JM, Rouet P, Pathak A, Smih F (2007) Adrenomedullin inhibits adipogenesis under transcriptional control of insulin. *Diabetes* 56(3): 553-563
- Hoegel F, Mueller CA, Peter R, Pfister U, Suedkamp NP (2004) Bone debris: dead matter or vital osteoblasts. *J Trauma* 56(2): 363-367
- Hosokawa S, Endoh T, Shibukawa Y, Tsumura M, Ichikawa H, Tazaki M, Furusawa M (2010) Calcitonin gene-related peptide- and adrenomedullin-induced facilitation of calcium current by different signal pathways in nucleus tractus solitaries. *Brain Res* 1327: 47-55
- Hung SC, Chen NJ, Hsieh SL, Li H, Ma HL, Lo WH (2002) Isolation and characterization of size-sieved stem cells from human bone marrow. *Stem Cells* 20(3): 249-258
- Iemura-Inaba C, Nishikimi T, Akimoto K, Yoshihara F, Minamino N, Matsuoka H (2008) Role of adrenomedullin system in lipid metabolism and its signaling mechanism in cultured adipocytes. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 295: 1376-1384
- Ito T, Suzuki A, Okabe M, Imai E, Hori M (2001) Application of bone marrow-derived stem cells in experimental nephrology. *Exp Nephrol* 9(6): 444-450
- Karlsson E, Stridsberg M, Sandler S (1998) Leptin regulation of islet amyloid polypeptide secretion from mouse pancreatic islets. *Biochem Pharmacol* 56(10): 1339-1346

- Katafuchi T, Kikumoto K, Hamano K, Kangawa K, Matsuo H, Minamino N (2003) Calcitonin receptor-stimulating peptide, a new member of the calcitonin gene-related peptide family. *J Biol Chem* 278(14): 12046-12054
- Katafuchi T, Yasue H, Osaki T, Minamino N (2009) Calcitonin receptor-stimulating peptide: Its evolutionary and functional relationship with calcitonin/calcitonin gene-related peptide based on gene structure. *Peptides* 30(9): 1753-1762
- Kawase T, Okuda A, Burns DM (2005) Immature osteoblastic MG63 possess two calcitonin gene-related peptide receptor subtypes that respond differently to Cys(Acm) calcitonin gene-related peptide and CGRP. *Am J Physiol Cell Physiol* 289(4): C811-818
- Kitamura K, Kangawa K, Kawamoto M, Ichiki Y, Nakamura S, Matsuo H, Eto T (1993) Adrenomedullin: a novel hypotensive peptide isolated from human pheochromocytoma. *Biochem Biophys Res Commun* 192(2): 553-560
- Kolar P, Gaber T, Perka C, Duda GN, Buttgerit F (2011) Human early fracture hematoma is characterized by inflammation and hypoxia. *Clin Orthop Relat Res*. 469(11): 3118-3126
- Kuwasako K, Cao YN, Nagoshi Y, Kitamura K, Eto T (2004) Adrenomedullin receptors: pharmacological features and possible pathophysiological roles. *Peptides* 25(11): 2003-2012
- Lam J, Sierra L, Cruzat C (1998) Paget disease of the bone: differential diagnosis of osteolytic lesions. Report of one case. *Rev Med Chil* 126(10): 1229-1233
- Lerner UH (2006) Deletions of genes encoding calcitonin/  $\alpha$ -CGRP, amylin and calcitonin receptor have given new and unexpected insights into the function of calcitonin receptors and calcitonin receptor-like receptors in bone. *J Musculoskelet Neuronal Interact* 6(1): 87-95
- Lewis JS, McCarthy DW, McCarthy TJ, Fujibayashi Y, Welch MJ (1999) Evaluation of  $^{64}\text{Cu}$ -ATSM in vitro and in vivo in a hypoxic tumor model. *J Nucl Med* 40(1): 177-183
- Lin HY, Harris TL, Flannery MS, Aruffo A, Kaji EH, Gorn A, Kolakowski LF Jr, Lodish HF, Goldring SR (1991) Expression cloning of an adenylate cyclase-coupled calcitonin receptor. *Science* 254(5034): 1022-1024
- McAllister RM, Gardner MB, Greene AE, Bradt C, Nichols WW, Landing BH (1971) Cultivation in vitro of cells derived from a human osteosarcoma. *Cancer* 27(2): 397-402
- McLatchie LM, Fraser NJ, Main MJ, Wise A, Brown J, Thompson N, Solari R, Lee MG, Foord SM (1998) RAMPs regulate the transport and ligand specificity of the calcitonin-receptor-like-receptor. *Nature* 393(6683): 333-339



- Minamino N, Kikumoto K, Isumi Y (2002) Regulation of adrenomedullin expression and release. *Microsc Res Tech* 57(1): 28-39
- Montuenga LM, Martinez A, Miller MJ, Unsworth EJ, Cuttitta F (1997) Expression of adrenomedullin and its receptor during embryogenesis suggests autocrine or paracrine modes of action. *Endocrinology* 138(1): 440-451
- Morfis M, Christopoulos A, Sexton PM (2003) RAMPs: 5 years on, where to now? *Trends Pharmacol Sci* 24(11): 596-601
- Morfis M, Tilakaratne N, Furness SG, Christopoulos SG, Werry TD, Christopoulos A, Sexton PM (2008) Receptor activity-modifying proteins differentially modulate the G-protein-coupling efficiency of amylin receptors. *Endocrinology* 149(11): 5423-5431
- Morimoto R, Satoh F, Murakami O, Totsune K, Suzuki T, Sasano H, Ito S, Takahashi K (2007) Expression of adrenomedullin/intermedin in human brain, heart, and kidney. *Peptides* 28(5): 1095-1103
- Muff R, Born W, Lutz TA, Fischer JA (2004) Biological importance of the peptides of the calcitonin family as revealed by disruption and transfer of corresponding genes. *Peptides* 25(11): 2027-2038
- Muff R, Bühlmann N, Fischer JA, Born W (1999) An amylin receptor is revealed following co-transfection of a calcitonin receptor with receptor activity modifying proteins-1 or -3. *Endocrinology* 140(6): 2924-2927
- Nagaya N, Mori H, Murakami S, Kangawa K, Kitamura S (2005) Adrenomedullin: angiogenesis and gene therapy. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 288(6): 1432-1437
- Nakamura M, Morimoto S, Yang Q, Hisamatsu T, Hanai N, Nakamura Y, Mori I, Kakudo K (2005) Osteoclast-like cells express receptor activity modifying protein 2: application of laser capture microdissection. *J Mol Endocrinol* 34(1): 257-261
- Nambu T, Arai H, Komatsu Y, Yasoda A, Moriyama K, Kanamoto N, Itoh H, Nakao K (2005) Expression of the adrenomedullin gene in adipose tissue. *Regul Pept* 132(1-3): 17-22
- Naot D, Callon KE, Grey A, Cooper GJ, Reid IR, Cornish J (2001) A potential role of adrenomedullin as a local regulator of bone growth. *Endocrinology* 142(5): 1849-1857
- Naot D, Cornish J (2008) The role of peptides and receptors of the calcitonin family in the regulation of bone metabolism. *Bone* 43(5): 813-818
- Nicholls MG (2004) Hemodynamic and hormonal actions of adrenomedullin. *Braz J Med Biol Res* 37(8): 1247-1253

- Ogawa K, Nishimura S, Uchiyama S, Kobayashi K, Kyogoku Y, Hayashi M, Kobayashi Y (1998) Conformation analysis of eel calcitonin - comparison with the conformation of elcatonin. *Eur J Biochem* 257(2): 331-336
- Olesen J, Diener HC, Husstedt IW, Goadsby PJ, Hall D, Meier U, Pollentier S, Lesko LM (2004) Calcitonin gene-related peptide receptor antagonist BIBN 4096 BS for the acute treatment of migraine. *N Engl J Med* 350(11): 1104-1110
- Owen TA, Bortell R, Yocum SA, Smock SL, Zhang M, Abate C, Shalhoub V, Aronin N, Wright KL, van Wijnen AJ (1990) Coordinate occupancy of AP-1 sites in the vitamin D-responsive and CCAAT box elements by Fos-Jun in the osteocalcin gene: model for phenotype suppression of transcription. *Proc Natl Acad Sci U S A* 87(24): 9990-9994
- Paulmyer-Lacroix O, Desbriere R, Poggi M, Achard V, Alessi MC, Boudouresque F, Ouafik L, Vuaroqueaux V, Labuhn M, Dutourand A, Grino M (2006) Expression of adrenomedullin in adipose tissue of lean and obese women. *Eur J Endocrinol* 155(1): 177-185
- Perry KJ, Quiza M, Myers DE, Morfis M, Christopoulos G, Sexton PM (1997) Characterization of amylin and calcitonin receptor binding in the mouse alpha-thyroid-stimulating hormone thyrotroph cell line. *Endocrinology* 138(8): 3486-3496
- Petersen BE, Bowen WC, Patrene KD, Mars WM, Sullivan AK, Murase N, Boggs SS, Greenberger JS, Goff JP (1999) Bone marrow as a potential source of hepatic oval cells. *Science* 284(5417): 1168-1170
- Pfeil U, Aslam M, Paddenbergh R, Quanz K, Chang CL, Park JI, Gries B, Rafiq A, Faulhammer P, Goldenberg A, Papadakis T, Noll T, Hsu SY, Weissmann N, Kummer W (2009) Intermedin/ adrenomedullin-2 is a hypoxia-induced endothelial peptide that stabilizes pulmonary microvascular permeability. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 297(5): L837-845
- Pondel M (2000) Calcitonin and calcitonin receptors: bone and beyond. *Int J Exp Pathol* 81(6): 405-422
- Pozvek G, Hilton JM, Quiza M, Houssami S, Sexton PM (1997) Structure/functions relationships of calcitonin analogues as agonists, antagonists or inverse agonists in a constitutively activated receptor cell system. *Mol Pharmacol* 51(4): 658-665
- Prado MA, Evans-Bain B, Dickerson IM (2002) Receptor component protein (RCP): a member of a multi-protein complex required for G-protein-coupled signal transduction. *Biochem Soc Trans* 30(4): 460-464

- Prado MA, Evans-Bain B, Oliver KR, Dickerson IM (2001) The role of the CGRP-receptor component protein (RCP) in adrenomedullin receptor signal transduction. *Peptides* 22(11): 1773-1781
- Qi T, Christopoulos G, Bailey RJ, Christopoulos A, Sexton PM, Hay DL (2008) Identification of N-terminal receptor activity-modifying protein residues important for calcitonin gene-related peptide, adrenomedullin, and amylin receptor function. *Mol Pharmacol* 74(4): 1059-1071
- Roh J, Chang CL, Bhalla A, Klein C, Hsu SY (2004) Intermedin is a calcitonin/calcitonin gene related peptide family peptide acting through the calcitonin receptor-like receptor/ receptor activity-modifying protein receptor complexes. *J Biol Chem* 279(8): 7264-7274
- Schöneberg T, Schultz G, Gudermann T (1999) Structural basis of G protein-coupled receptor function. *Mol Cell Endocrinol* 151(1-2): 181-193
- Sexton PM, Albiston A, Morfis M, Tilakaratne N (2001) Receptor activity modifying proteins. *Cell Signal* 13(2): 73-83
- Siggelkow H, Hilmes D, Robenstorff K, Kurre W, Engel I, Hüfner M (1998) Analysis of human primary bone cells by fluorescence activated cell scanning: methodological problems and preliminary results. *Clin Chim Acta* 272(2): 111-125
- Siggelkow H, Schenck M, Rohde M, Viereck V, Tauber S, Atkinson MJ, Hüfner M (2002) Prolonged culture of HOS 58 human osteosarcoma cells with 1,25-(OH)<sub>2</sub>-D<sub>3</sub>, TGF-beta, and dexamethasone reveals physiological regulation of alkaline phosphatase, dissociated osteocalcin gene expression, and protein synthesis and lack of mineralization. *J Cell Biochem* 85(2): 279-294
- Steinbrech DS, Mehrara BJ, Saadeh PB, Greenwald JA, Spector JA, Gittes GK, Longaker MT (2000) VEGF expression in an osteoblast-like cell is regulated by a hypoxia response mechanism. *Am J Physiol Cell Physiol* 278(4): C853-860
- Strauer BE, Brehm M, Zeus T, Köstering M, Hernandez A, Sorg RV, Kögler G, Wernet P (2002) Repair of infarcted myocardium by autologous intracoronary mononuclear bone marrow cell transplantation in humans. *Circulation* 106(15): 1913-1918
- Takei Y, Inoue K, Ogoshi M, Kawahara T, Bannai H, Miyano S (2004) Identification of novel adrenomedullin in mammals: a potent cardiovascular and renal regulator. *FEBS Lett* 556(1-3): 53-58
- Thota C, Gangula PR, Dong YL, Yallampalli C (2003) Changes in the expression of calcitonin receptor-like receptor, receptor activity-modifying protein (RAMP) 1, RAMP 2, RAMP 3 in rat uterus during pregnancy, labor, and by steroid hormone treatments. *Biol Reprod* 69(4): 1432-1437

- Togari A, Arai M, Mizutani S, Mizutani S, Koshihara Y, Nagatsu T (1997) Expression of mRNAs for neuropeptide receptors and  $\beta$ -adrenergic receptors in human osteoblasts and human osteogenic sarcoma cells. *Neurosci Lett* 233(2-3): 125-128
- Trinkaus K, Wenisch S, Siemers C, Hose D, Schnettler R (2005) Reming debris: a source of vital cells! First results of human specimens. *Unfallchirurg* 108(8): 650-656
- Udawela M, Hay DL, Sexton PM (2004) The receptor activity-modifying protein family of G protein coupled receptor accessory proteins. *Semin Cell Dev Biol* 15(3): 299-308
- Utting JC, Flanagan AM, Brandao-Burch A, Orriss IR, Arnett TR (2010) Hypoxia stimulates osteoclast formation from human peripheral blood. *Cell Biochem Funct* 28(5): 374-380
- Utting JC, Robins SP, Brandao-Burch A, Orriss IR, Behar J, Arnett TR (2006) Hypoxia inhibits the growth, differentiation and bone-forming capacity of rat osteoblasts. *Exp Cell Res* 312(10): 1693-1702
- Uzan B, Villemin A, Garel JM, Cressent M (2008) Adrenomedullin is anti-apoptotic in osteoblasts through CGRP1 receptors and MEK-ERK pathway. *J Cell Physiol* 215(1): 122-128
- Vause CV, Durham PL (2010) Calcitonin gene-related peptide differentially regulates gene and protein expression in trigeminal glia cells: Findings from array analysis. *Neurosci Lett* 473(3): 163-167
- Wenisch S, Trinkaus K, Hild A, Hose D, Herde K, Heiss C, Kilian O, Alt V, Schnettler R (2004) Human reaming debris: a source of multipotent stem cells. *Bone* 36(1): 74-83
- Wimalawansa SJ (1997) Amylin, calcitonin gene-related peptide, calcitonin, and adrenomedullin: a peptide superfamily. *Crit Rev Neurobiol* 11(2-3): 167-239
- Wojcik MH, Meenaghan E, Lawson EA, Misra M, Klibanski A, Miller KK (2010) Reduced amylin levels are associated with low bone mineral density in woman with anorexia nervosa. *Bone* 46(3): 796-800
- Wookey PJ, Cao Z, van Geenen RC, Voskuil M, Darby IA, Komers R, Cooper ME (1997) Increased density of renal amylin binding sites in experimental hypertension. *Hypertension* 30(3): 455-460
- Yang JH, Qi YF, Jia YX, Pan CS, Zhao J, Yang J, Chang JK, Tang CS (2005) Protective effects of intermedin/adrenomedullin2 of ischemia/reperfusion injury in isolated rat hearts. *Peptides* 26(3): 501-507

Young A (1997) Role of amylin in nutrient intake - animal studies. Diabet Med 2: 14-18

Yun HJ, Lee EG, Lee SI, Chae HJ, Yoo WH (2009) Adrenomedullin inhibits MAPK-pathway-dependent rheumatoid synovial fibroblast-mediated osteoclastogenesis by IL-1 and TNF $\alpha$ . Rheumatol Int 29(10): 1161-1168

## 11 Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich herzlichst bei allen Mitarbeitern und Mitarbeiterinnen des Labors für experimentelle Unfallchirurgie in Gießen bedanken, ohne die diese Arbeit nicht zu Stande gekommen wäre.

Zuerst danke ich dem Direktor der Klinik und Poliklinik für Unfallchirurgie der Justus-Liebig-Universität Gießen, Herrn Univ.-Prof. Prof. h.c. Dr. Dr. Dr. h.c. R. Schnettler, für die Möglichkeit, diese Arbeit in seinem Labor für experimentelle Unfallchirurgie anfertigen zu dürfen.

Mein besonderer Dank gilt Frau Prof. Dr. K. S. Lips, die mir dieses Dissertationsthema überlassen hat und mir stets bei Problemen und Fragen zur Seite stand. Für die ausgezeichnete Betreuung, die unermüdliche Diskussionsbereitschaft, die wertvollen Anregungen und kritische Durchsicht dieser Arbeit möchte ich ihr an dieser Stelle herzlichst danken.

Weiterhin gilt meine Dankbarkeit Frau Dr. med. vet. K. Trinkaus für die hervorragende Einarbeitung in die Thematik der Zellkultur.

Ich danke herzlichst Herrn Dr. rer. nat. Uwe Pfeil aus dem Institut für Anatomie und Zellbiologie, da er mir sämtliche Primer, die ich für meine Untersuchungen benötigte, zur Verfügung stellte.

Frau Dipl. Biol. S. Hartmann danke ich für ihre tatkräftige Unterstützung in molekularbiologischen Fragestellungen und ihre wertvollen Ratschläge zur Durchführung der PCR.

Für das geduldige Zuhören und die stete Unterstützung in allen Herausforderungen, die mir die Laborarbeit tagtäglich stellte, möchte ich mich herzlichst bei Frau I. Oberst, Frau I. Schütz, Frau I. Bergen und Herrn R. Braun bedanken.

Nicht zuletzt danke ich meiner Familie und meinem Freund, ohne deren Unterstützung und Rückhalt ich auf meinen Wegen nie so weit gekommen wäre.

Danke!



*édition scientifique*  
**VVB LAUFERSWEILER VERLAG**

**VVB LAUFERSWEILER VERLAG**  
STAUFENBERGRING 15  
D-35396 GIESSEN

Tel: 0641-5599888 Fax: -5599890  
redaktion@doktorverlag.de  
www.doktorverlag.de

ISBN: 978-3-8359-6037-4



9 783835 960374